



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : <b>C12M 1/33, C12N 1/06, C12M 3/08</b>		A1	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 99/15621</b>  (43) Date de publication internationale: 1er avril 1999 (01.04.99)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/IB98/01475	(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).		
(22) Date de dépôt international: 23 septembre 1998 (23.09.98)			
(30) Données relatives à la priorité: 97/12164 23 septembre 1997 (23.09.97) FR			
(71) Déposant ( <i>pour tous les Etats désignés sauf US</i> ): BIO MERIEUX [FR/FR]; Chemin de l'Orme, F-69280 Marcy l'Etoile (FR).			
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants ( <i>US seulement</i> ): CLEUZIAT, Philippe [FR/FR]; 16, rue de l'Espérance, F-69003 Lyon (FR). SANTORO, Lyse [FR/FR]; 47, avenue Bergeron, F-69269 Charbonnières les Bains (FR).			(Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i>
(74) Mandataire: CABINET GERMAIN & MAUREAU; Boîte postale 6153, F-69466 Lyon Cedex 06 (FR).			

(54) Title: LYSIS METHOD FOR MICRO-ORGANISMS

(54) Titre: PROCEDE DE LYSE DE MICRO-ORGANISME

## (57) Abstract

The invention concerns a lysis method for a biological sample comprising at least one micro-organism of the bacteria type, for releasing a nucleic material of interest belonging to said micro-organism, which consists in: providing in a container a biological sample in liquid medium; providing in said container at least one particulate material, relatively hard, and substantially inert with respect to the nucleic material; submitting the biological sample and particulate material mixture to a movement. The invention is characterised in that in combination, the selected movement is of the vortex type, and satisfies the following conditions: the particulate material consists of beads with diameter between 90 and 150  $\mu\text{m}$ ; and the apparent volume of the beads ( $V_b$ ) and the volume of the liquid sample ( $V_e$ ) are linked by the relationship  $V_e = \alpha \cdot V_b$ , with  $\alpha$  ranging between 1.4 and 10 when the container is tubular in shape, and  $\alpha$  is not more than 2.1 when the container is in the shape of a disk; under such conditions, without any addition of reagent and/or additional process, the method consists in releasing directly into the liquid medium the nucleic material in native state and accessible to any reagent in a subsequent process.

## (57) Abrégé

Procédé de lyse d'un échantillon biologique comprenant au moins un micro-organisme de type bactérie, pour libérer un matériel nucléique d'intérêt appartenant audit micro-organisme, selon lequel: on dispose dans un contenant un échantillon biologique en milieu liquide, on dispose dans ledit contenant au moins un matériau particulaire, relativement dur, et实质iellement inerte par rapport au matériel nucléique, on soumet le mélange de l'échantillon biologique et du matériau particulaire à un mouvement, caractérisé en ce que, en combinaison: le mouvement choisi est de type vortex, et répond aux conditions suivantes: le matériau particulaire est constitué de billes de diamètre compris entre 90 et 150  $\mu\text{m}$ , et le volume apparent des billes,  $V_b$ , et le volume de l'échantillon liquide,  $V_e$ , sont liés par la relation  $V_e = \alpha \cdot V_b$ , avec  $\alpha$  compris entre 1,4 et 10 lorsque le contenant est de forme tubulaire, et  $\alpha$  est inférieur ou égal à 2,1 lorsque le contenant est de forme disque, moyennant quoi, sans ajout de réactif et/ou étape opératoire supplémentaire, on libère directement dans le milieu liquide le matériel nucléique à l'état natif et accessible à tout réactif de traitement postérieur.

BEST AVAILABLE COPY

**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		

## PROCEDE DE LYSE DE MICRO-ORGANISME

La présente invention concerne un procédé de lyse de micro-organisme, permettant de manière générale de rompre ce dernier, notamment la membrane d'une ou plusieurs cellules, pour libérer au moins un matériel nucléique d'intérêt, par exemple acide désoxyribonucléique (ADN) et acide ribonucléique (ARN) à traiter postérieurement, notamment analyser.

Le document US-C-5,643,767 divulgue un procédé de lyse pour séparer les ADN ou ARN de cellules dans une solution liquide. On utilise à cette fin un contenant qui contient un solvant pour extraire l'ARN ou l'ADN, une pluralité de particules ayant 0,1 à 1 mm de diamètre, et au moins une particule plus grande ayant de 3 à 5 mm de diamètre. Un mouvement est appliqué au contenant ainsi rempli, à savoir un mouvement de secousse. Il est expressément indiqué dans ce document que ce mouvement est préféré à un mouvement de rotation, tel que généré avec un mélangeur ou autre homogénéiseur, parce que avec un mouvement de rotation les cellules ne font simplement que tourner dans le même sens, et n'ont pas de collision efficace entre elles et avec les billes, pour être écrasées entre les billes.

Le document US-C-4,295,613 divulgue un appareil pour rompre des bactéries, selon lequel l'échantillon contenant les cellules est disposé dans un tube en contact avec de fines billes. Les billes, d'un diamètre de l'ordre de 70 à 110 µm, sont introduites dans le tube, avec l'échantillon à traiter et toute solution tampon nécessaire, puis on applique au contenant ou tube un mouvement d'oscillation selon un axe horizontal, afin d'obtenir les constituants sub-cellulaires en solution tels que enzymes, protéines, carbohydrates,...

Le document FR-A-1576299 divulgue un procédé pour rompre des cellules végétales et animales, selon lequel on utilise un matériau particulaire, dont la dimension des particules est de 0,05 à 1 mm de diamètre, les particules

pouvant être en acier ou autre matériau analogue. Un mouvement est appliqué au mélange de l'échantillon biologique et des particules, selon un écoulement laminaire.

5 Le document EP-A-0317 803 divulgue un procédé pour générer des liposomes multilamellaires encapsulant un milieu aqueux. Le procédé consiste à mélanger des lipides et le milieu aqueux à encapsuler, à agiter le mélange dans un contenant en présence de particules ayant un diamètre inférieur à 3 mm, la taille préférée étant 50 à 100 µm, pour obtenir des liposomes ayant un diamètre d'environ 150 à 3000 nanomètres.

Le document EP-A-0796 917 divulgue un dispositif qui libère des particules dans un échantillon biologique 15 contenant des cellules. Lorsque l'échantillon est agité ou soniqué, ce dispositif comprend une cloison qui retient les particules durant une durée suffisante, et ensuite les libérer et rompre les cellules, ce qui permet ainsi de rendre accessibles les acides nucléiques. Les particules 20 retenues par la cloison, qui sont en verre, en plastique, ou en métal tel que le zirconium, peuvent avoir des formes différentes, et ont un diamètre d'environ 0,1 à 0,15 mm. Une particule est affectée à casser la cloison, et a un diamètre d'environ 1 à 4 mm, de préférence 3 mm. 25 L'appareil de mise en mouvement alternatif est un agitateur de marque BioSpec®.

Le document EP-A-0288618 divulgue un procédé de lyse cellulaire, dont des micro-organismes, pour libérer des constituants sub-cellulaires incluant ADN et ARN en 30 solution. L'échantillon biologique est placé dans un contenant avec des particules de tailles différentes. Le contenant est alors soumis à sonication jusqu'à ce que les cellules libèrent leurs constituants. Les ultra-sons mettent les particules en vibration à travers 35 l'échantillon, ce qui provoque la rupture des cellules par cisaillement. Les particules sont des billes de verre de

diamètre compris entre 0,05 et 1 mm. Le temps de sonication est de 10 minutes à température ambiante. L'ARN et l'ADN sont libérés de manière accessible à des sondes génétiques nucléiques d'hybridation.

5       Le document US-C-5,464,773 divulgue un appareil pour lyser des cellules, sans détruire les constituants sub-cellulaires, pour notamment libérer l'ARN et l'ADN afin d'effectuer postérieurement une hybridation. Le contenant utilisé contient deux tailles de billes en  
10 zirconium, verre, ou matière plastique ou autre. Dans un mode préféré, le contenant contient 400 µl de particules de zirconium de deux tailles et poids différents, par exemple 0,7 g et 0,1 mm de diamètre et 0,65 g et 0,5 mm de diamètre. Le mouvement appliqué au contenant est un  
15 mouvement de type vibratoire, en particulier oscillatoire.

Le document US-C-4,666,850 divulgue un appareil et un procédé pour lyser un échantillon sanguin lors de sa centrifugation. Le contenant recevant l'échantillon sanguin contient des particules ou billes, en matière  
20 plastique ou en verre, qui doivent avoir une taille qui n'empêche pas la sédimentation des bactéries au fond du tube lors de la centrifugation.

Le document EP-A-0341215 divulgue un procédé pour produire des protéines hétérologues à partir de levures transformées génétiquement. Afin d'évaluer la quantité de protéines, il est précisé simplement que pour lyser les cellules, on applique des forces mécaniques de cisaillement en secouant l'échantillon biologique contenant les levures avec des billes de verre.  
25

30       Le document EP-A-0284044 divulgue un procédé pour augmenter la production de protéines dans les levures. Il est indiqué que les cellules (levures), pour l'analyse de la quantité de protéines, sont lysées de préférence en appliquant un mouvement de type vortex à l'échantillon biologique, avec des billes de verre de diamètre 450-500

μm à vitesse maximale pendant une minute, trois fois de suite.

Le document US-C-4,775,622 divulgue un procédé pour exprimer et récupérer des protéines à partir d'une 5 culture de levures.

Les procédés généralement utilisés pour lyser un échantillon biologique comprenant au moins un micro-organisme, spécifiquement pour libérer au moins un matériel nucléique d'intérêt, consistent essentiellement 10 selon l'art antérieur en ce que:

- on dispose dans un contenant un échantillon biologique en milieu liquide, comprenant le micro-organisme à lyser,

- on dispose dans ledit contenant au moins un 15 matériau particulaire, relativement dur, et substantiellement inerte par rapport au matériau nucléique,

- et on soumet le mélange de l'échantillon biologique et du matériau particulaire essentiellement à 20 un mouvement alternatif, d'amplitude et/ou fréquence variable s'il s'agit d'un mouvement régulier, selon la technique ou l'équipement retenu pour la mise en mouvement.

Ces procédés utilisés présentent certains 25 inconvénients. Ils ne sont pas suffisamment efficaces, notamment la lyse cellulaire s'avère insuffisante pour libérer le matériel nucléique en quantité et qualité.

De plus, ils ne permettent pas toujours de lyser des cellules réputées résistantes à la lyse, notamment les 30 cellules des bactéries à Gram+, par exemple celles de Mycobactéries.

De même, la mise en oeuvre de ces procédés nécessite souvent l'ajout de réactifs supplémentaires tels que par exemple des enzymes et/ou des détergents.

35 Selon la présente invention, on a trouvé que, contrairement à l'enseignement divulgué dans le brevet US

5,643,767, un mouvement rotatoire de type Vortex était particulièrement adapté, pour lyser des micro-organismes et libérer directement le matériau nucléique d'intérêt, à la condition de choisir certains paramètres pour ce 5 mouvement, en relation notamment avec le contenant.

L'invention a donc pour objet un procédé de lyse complète, efficace et simple d'un échantillon biologique comprenant au moins un micro-organisme, sans réactif et/ou étape opératoire supplémentaire au cours de la mise en 10 oeuvre du procédé.

La premier objet de la présente invention est donc un procédé de lyse d'un échantillon biologique comprenant au moins un micro-organisme de type bactérie, pour libérer au moins un matériel nucléique d'intérêt appartenant audit 15 micro-organisme, selon lequel:

- on dispose dans un contenant ledit échantillon biologique en milieu liquide,
- on dispose dans ledit contenant au moins un matériau particulaire, relativement dur, et 20 substantiellement inerte par rapport au matériel nucléique,

- on soumet le mélange de l'échantillon biologique et du matériau particulaire à un mouvement, caractérisé en ce que, en combinaison:  
25 le mouvement choisi est de type vortex, et répond aux conditions suivantes:

- le matériau particulaire est constitué de billes de diamètre compris entre 90 et 150  $\mu\text{m}$ , et
- le volume apparent des billes,  $V_b$ , et le volume 30 de l'échantillon liquide,  $V_e$ , sont liés par la relation  $V_e = \alpha \cdot V_b$ , avec  $\alpha$  compris entre 1,4 et 10 lorsque le contenant est de forme tubulaire, et  $\alpha$  est inférieur ou égal à 2,1 lorsque le contenant est de forme disque,

- moyennant quoi, sans ajout de réactif et/ou étape 35 opératoire supplémentaire, on libère directement dans le

milieu liquide le matériel nucléique à l'état natif et accessible à tout réactif.

Un second objet selon l'invention est un procédé de lyse d'un échantillon biologique comprenant au moins un 5 micro-organisme de type levure, pour libérer au moins un matériel nucléique d'intérêt appartenant audit micro-organisme, selon lequel:

- on dispose dans un contenant ledit échantillon biologique en milieu liquide,
- 10 - on dispose dans ledit contenant au moins un matériau particulaire, relativement dur, et substantiellement inerte par rapport au matériel nucléique,

- on soumet le mélange de l'échantillon biologique 15 et du matériau particulaire à un mouvement, caractérisé en ce, que en combinaison:

le mouvement choisi est de type vortex, et répond aux conditions suivantes:

- le matériau particulaire est constitué de billes 20 ayant un diamètre d'environ 500  $\mu\text{m}$ , et

- le volume apparent des billes ,  $V_b$ , et le volume de l'échantillon liquide,  $V_e$ , sont liés par la relation  $V_e = \alpha \cdot V_b$ , avec  $\alpha$  compris entre 1,4 et 10 lorsque le 25 contenant est de forme tubulaire, et  $\alpha$  inférieur ou égal à 2,1 lorsque le contenant est de forme disque,

moyennant quoi, sans ajout de réactif et/ou étape opératoire supplémentaire, on libère dans le milieu liquide le matériel nucléique à l'état natif et accessible à tout réactif.

30 Par le procédé selon l'invention, on obtient le matériel nucléique à l'état natif, ce qui veut dire qu'il est pour l'essentiel non détérioré, par exemple non dénaturé, ou qu'il conserve pratiquement toutes les caractéristiques ou propriétés qu'il avait au sein de la 35 cellule ou organisme dont il est extrait.

Par ailleurs, le procédé selon l'invention est suffisamment efficace pour permettre la lyse d'un seul micro-organisme, ce qui pour beaucoup de procédés d'analyse biologique, notamment pour les techniques 5 d'amplification ou d'analyse par hybridation de sonde(s) nucléique(s) revêt un intérêt particulier.

S'agissant du matériel nucléique, la présente invention apporte l'avantage déterminant de libérer ledit matériel de manière directement accessible pour tout 10 protocole postérieur le concernant, par exemple une ou des amorces d'amplification, une ou des sondes d'hybridation...

Par conséquent, selon la présente invention, l'échantillon biologique lysé obtenu, peut être traité 15 directement, c'est à dire sans étape opératoire intermédiaire, ou sans réactif ajouté, selon tout protocole opératoire en relation avec le matériel nucléique d'intérêt libéré, tel que amplification, analyse, etc., avec tous réactifs nucléiques appropriés, 20 ou autres.

Dans un mode de réalisation préféré selon le premier objet de l'invention, le matériau particulaire est constitué de billes de diamètre d'environ 100 µm, pour un micro-organisme du type bactérie.

25 Dans un autre mode de réalisation selon le premier ou second objet de l'invention, le mouvement de type vortex répond en outre à la relation suivante:

$$V_b < V_e < V_c, \text{ selon laquelle}$$

$$V_c = \beta \cdot V_e, \text{ et}$$

30  $\beta$  est supérieur ou égal à 2,5, avec  $V_c$  le volume utile du contenant.

Les contenants que l'on peut utiliser selon l'invention peuvent être de formats différents, par exemple de forme tubulaire ou de forme disque.

On préfère que le contenant soit de forme 35 tubulaire, de préférence à fond en forme de U. Dans ce

mode de réalisation préféré,  $\beta$  est un nombre compris entre 2,5 et 30.

Dans encore un autre mode de réalisation selon l'invention, les contenants sont de forme disque et de forme tubulaire à fond en forme de U (comme par exemple de type Falcon®) ou à fond tronconique (comme par exemple de type Eppendorf®).

Lorsque le contenant est sous forme disque,  $\alpha$  est un nombre inférieur ou égal à 2,1, de préférence inférieur ou égal à 1,4 et  $\beta$  est un nombre supérieur ou égal à 9,3.

On préfère que le contenant soit un tube à fond tronconique tel qu'un tube Eppendorf,  $\alpha$  étant compris entre 1,4 et 10, de préférence entre 1,4 et 3,3, et  $\beta$  étant compris entre 2,5 et 30, de préférence entre 2,5 et 15, de préférence encore entre 3,75 et 15.

On préfère encore que le contenant soit un tube à fond en U, tel qu'un tube Falcon,  $\alpha$  étant compris entre 1,4 et 10, de préférence entre 1,4 et 3,3, de préférence encore est égal à 3,3, et  $\beta$  étant compris entre 3 et 30, de préférence entre 12 et 30, de préférence encore est égal à 20.

Dans encore un autre mode de réalisation selon l'invention, le matériau particulaire comprend d'autres billes ayant un diamètre supérieur à celui desdites billes. On préfère que le contenant comprenne jusqu'à 16, de préférence 10 autres billes. On préfère encore plus que ces autres billes aient un diamètre environ de 2 à 3 mm.

Cette caractéristique complémentaire du procédé selon l'invention permet, pour une efficacité équivalente, en particulier de diminuer ou limiter le temps requis pour la lyse de l'échantillon biologique.

Cette caractéristique complémentaire permet aussi de rompre des échantillons biologiques complexes, tels que tissus vivants, avant la lyse proprement dite.

Dans encore un autre mode de réalisation selon l'invention, on peut ajouter à l'échantillon biologique

une substance anti-mousse à une concentration finale de 0,01 à 1% en volume, de préférence de 0,5 à 1% du volume de l'échantillon liquide, Ve.

On peut encore, selon un autre mode de réalisation, ajouter à l'échantillon biologique un détergent de type anionique à une concentration finale de 2,5% du volume de l'échantillon liquide, Ve.

Dans un mode de réalisation préféré selon le premier objet de l'invention, le temps de mise en mouvement de type vortex est au moins égal à 10 secondes, de préférence au moins 20 secondes, avantageusement entre 1 et 5 minutes.

Le temps de vortex est adapté de manière à obtenir un pourcentage de lyse au moins supérieur ou égale à 20%.

On préfère encore, selon les spécificités du protocole de lyse utilisé, notamment lorsqu'on ajoute des billes de plus gros diamètre, que le temps de mise en mouvement de type vortex soit d'environ 2 minutes.

Dans un mode de réalisation préféré selon le second objet de l'invention, le temps de mise en mouvement de type vortex est compris entre 8 et 20 minutes.

Etant donné que le lysat obtenu permet directement de détecter et/ou quantifier et/ou amplifier le matériel nucléique d'intérêt, la présente invention concerne également un procédé de traitement d'un échantillon biologique comprenant un micro-organisme comportant un matériel nucléique d'intérêt, ledit procédé comprenant:

a) une étape de lyse, selon laquelle:

- on dispose dans un contenant ledit échantillon biologique en milieu liquide,

- on dispose dans ledit contenant au moins un matériau particulaire, relativement dur, et substantiellement inerte par rapport au matériel nucléique,

- et on soumet le mélange de l'échantillon biologique et du matériau particulaire à une mise en mouvement du type vortex, selon laquelle en combinaison:

5 - les billes ont un diamètre compris entre 90 et 150  $\mu\text{m}$  pour un micro-organisme de type bactérie, et d'environ 500  $\mu\text{m}$  pour un micro-organisme de type levure,

10 - le volume apparent des billes,  $V_b$ , et le volume de l'échantillon liquide,  $V_e$ , sont liés par la relation  $V_e = \alpha V_b$ , avec  $\alpha$  compris entre 1,4 et 10 lorsque le contenant est de forme tubulaire, et  $\alpha$  est inférieur ou égal à 2,1, lorsque le contenant est en forme de disque,

15 b) on soumet l'échantillon biologique lysé, avec ou sans le matériau particulaire ayant servi à la lyse, directement à un protocole opératoire concernant spécifiquement le matériel nucléique d'intérêt par exemple amplification et/ou détection et/ou quantification nucléique.

Ainsi, par exemple après amplification, on peut détecter au moins  $1.10^2$  cellules/ml.

20 Un troisième objet selon l'invention est un contenant à usage unique, pour la mise en oeuvre d'un procédé décrit précédemment, caractérisé en ce qu'il comprend une charge d'un matériau particulaire adaptée, en fonction d'un volume prédéterminé de l'échantillon 25 biologique, à la mise en oeuvre directe du procédé décrit précédemment.

Par "échantillon biologique", on entend tout échantillon, prélèvement ou fraction d'un matériel biologique, simple ou complexe, par exemple un tissu 30 vivant ou un liquide ou fluide corporel. Cet échantillon biologique contient au moins un micro-organisme à lyser, avec ou sans traitement préalable de la structure comprenant ledit micro-organisme, par exemple destruction de l'organisation du tissu.

35 Par "micro-organisme", on entend tout matériau biologique, comprenant naturellement une membrane ou

enveloppe fermée, un ou plusieurs constituants biologiques d'intérêt, sub-cellulaires, renfermés à l'intérieur de ladite membrane ou enveloppe, à savoir nucléiques (ADN ou ARN). A titre d'exemple, on peut citer bien entendu les 5 micro-organismes procaryotes, tels que les bactéries et archaebactéries, les micro-organismes eucaryotes tels que les cellules végétales ou animales, les levures et les champignons, également différents tissus vivants, et par extension des particules virales.

10 Par le terme " lyse ", on entend tout processus permettant de rompre la membrane ou l'enveloppe précitée pour libérer le matériel nucléique d'intérêt, sous forme totale ou partielle.

15 Les figures et les exemples qui suivent permettent d'illustrer l'objet de l'invention, mais ne limitent en rien la portée de celle-ci.

La figure 1 illustre le pourcentage de lyse (en ordonnée) en fonction du diamètre des billes (en abscisse), et de la composition du mélange (nature et 20 proportion des billes).

" SI " signifie " solution initiale " et représente le témoin qui n'a pas été lysé.

A : Billes de verre de 1 à 50 µm  
B : Billes de verre de 50 à 100 µm  
25 C : Billes de verre de 90 à 150 µm  
D : Billes de verre 100 µm  
E : Billes de zirconium 100 µm  
F : Billes de zirconium 500 µm  
G : Mélange 50/50 de billes de zirconium de 100 et  
30 500 µm.

La figure 2 illustre la quantité d'acides nucléiques de *S.epidermidis* détectée (en ordonnée) en fonction du diamètre des billes (en abscisse).

" SI " signifie " solution initiale " et 35 représente le témoin qui n'a pas été lysé.

A : Billes de verre de 1 à 50 µm

- B : Billes de verre de 50 à 100  $\mu\text{m}$   
C : Billes de verre de 90 à 150  $\mu\text{m}$   
D : Billes de verre 100  $\mu\text{m}$   
E : Billes de zirconium 100  $\mu\text{m}$   
5 F : Billes de zirconium 500  $\mu\text{m}$   
G : Mélange 50/50 de billes de zirconium de 100 et  
500  $\mu\text{m}$ .

La figure 3 illustre le pourcentage de lyse (en ordonnées) en tube Eppendorf en fonction du coefficient a (en abscisse).

La figure 4 illustre le pourcentage de lyse (en ordonnées) en tube Falcon en fonction du coefficient a (en abscisse).

La figure 5 illustre le pourcentage de lyse (en ordonnées) dans un contenant en forme de disque en fonction du coefficient a (en abscisse).

La figure 6 illustre le pourcentage de lyse (en ordonnées) en tube Eppendorf en fonction du coefficient b (en abscisse).

20 La figure 7 illustre le pourcentage de lyse (en ordonnées) en tube Falcon en fonction du coefficient b (en abscisse).

La figure 8 illustre le pourcentage de lyse (en ordonnées) dans un contenant en forme de disque en 25 fonction du coefficient b (en abscisse).

La figure 9 illustre le pourcentage de lyse (en ordonnées) en fonction de la géométrie du contenant (en abscisse).

A : tube Eppendorf à fond en forme de V,  $V_c = 1,5$   
30 ml

B : cuvette de spectrophotométrie à fond plat,  $V_c = 5 \text{ ml}$

C : tube à fond plat,  $V_c = 30 \text{ ml}$   
D : tube à fond plat,  $V_c = 60 \text{ ml}$   
35 E : bouteille de verre à fond plat,  $V_c = 8 \text{ ml}$   
F : bouteille de verre à fond plat,  $V_c = 25 \text{ ml}$

G : tube en polystyrène à fond en forme de U, Vc = 6 ml

H: tube en polystyrène à fond en forme de U, Vc = 14 ml

5 I : tube en polystyrène à fond en forme de U, Vc = 22 ml

J : tube en polypropylène à fond en forme de U, Vc = 6 ml

10 K : tube en polypropylène à fond en forme de U, Vc = 14 ml

L : tube en polypropylène à fond en forme de U, Vc = 22 ml

M : tube en polypropylène à fond en forme de U, Vc = 4 ml.

15 La figure 10 illustre le pourcentage de lyse (en ordonnées) en fonction de différentes billes ajoutées (en abscisse).

La figure 11 illustre le pourcentage de lyse (en ordonnées) en fonction de combinaisons de différentes 20 billes ajoutées (en abscisse).

A : 10 billes inox de diamètre 2 mm

B : 10 billes de verre de diamètre 3 mm

C : 5 billes inox et 5 billes de verre de diamètres respectifs 2 et 3 mm

25 D : 4 billes inox et 4 billes de verre de diamètres respectifs 2 et 3 mm

E : 5 billes inox et 3 billes de verre de diamètres respectifs 2 et 3 mm

30 F : 3 billes inox et 5 billes de verre de diamètres respectifs 2 et 3 mm.

La figure 12 illustre le pourcentage de lyse (en ordonnées) en fonction du temps de mise en mouvement de type vortex (en abscisse) pour les protocoles I et II de l'exemple 5.

35 La figure 13 illustre le pourcentage de lyse (en ordonnées) en fonction du temps de mise en mouvement de

type vortex (en abscisse) pour les protocoles II et III de l'exemple 5.

Afin de déterminer l'efficacité du procédé de lyse 5 selon l'invention, on a mis au point un protocole test général d'analyse du lysat obtenu en mesurant le pourcentage de lyse.

Ce protocole général est décrit ci-après.

Des bactéries à paroi Gram+ *Staphylococcus epidermidis* (bioMérieux référence API N° 8149310) 10 sont cultivées en milieu liquide BCC (Bouillon Coeur Cervelle) sont centrifugées à 2500 tours/minute pendant 10 minutes à 25°C, avant d'être resuspendues indifféremment en milieu BCC ou en tampon de lyse à la concentration  $5.10^9$  cellules 15 /300 µl. La composition du tampon de lyse est la suivante: 30mM Tris-Hcl, 5mM EDTA, 100 mM NaCL, pH 7.2. 300 µl de la suspension sont ajoutés dans un tube contenant préalablement un volume défini de billes de verre. Le tube fermé est mis en mouvement de type vortex pendant 2 20 minutes, à puissance maximale de l'appareil (Reax 2000, Heidolph). La suspension bactérienne ainsi traitée est conservée dans la glace avant analyse.

Le pourcentage de lyse est déterminé immédiatement après recueil de l'échantillon, par mesure de la densité 25 optique à 550 nm. Le pourcentage de lyse est égal au rapport de la valeur de DO à 550 nm de la solution bactérienne après vortex sur la valeur de DO à 550 nm avant vortex.

La qualité des acides nucléiques libérés par 30 l'étape de vortex est vérifiée sur gel d'agarose 0,8%. 10 µl du lysat sont déposés par puits, la migration est réalisée sous voltage constant (150V) et le gel est coloré au bromure d'éthidium (BET) avant observation sous rayonnement ultra-violet.

35 La quantité d'acides nucléiques libérés par l'étape de vortex est déterminée par détection spécifique

selon la technique d'hybridation dite sandwich en utilisant l'appareil Vidas® commercialisé par bioMérieux (France). Des sondes oligonucléotidiques de capture et de détection spécifiques des acides nucléiques de *S. epidermidis* (voir le brevet EP 0632269) ont été choisies. Les oligonucléotides de capture et de détection ont respectivement pour séquence : 5'-GACCACCTGTCACTCTGTCCC-3' (SEQ ID N°:1) et 5'GGAAAGGGAAAATCTATCTC-3' (SEQ ID N°:2). La sonde de détection est marquée par couplage avec la phosphatage alcaline (PA). L'hybridation spécifique de ces sondes avec les acides nucléiques libérés dans le lysat est fonction de la quantité d'acides nucléiques présents, mais aussi de leur accessibilité pour les sondes utilisées.

Deux protocoles d'amplification spécifiques des molécules d'ADN et d'ARN de *S. epidermidis* ont été réalisés à partir des lysats recueillis pour vérifier si les acides nucléiques libérés par vortex peuvent être amplifiés : un protocole PCR pour l'amplification de l'ADN et un protocole NASBA pour l'amplification de l'ARNrl6S.

Protocole PCR : la technique de PCR suivie est celle décrite par Goodman dans *PCR stratégies*, Ed : Innis, Gelford et Sninsky Académie press 1995, pp 17-31. Deux amorces d'amplification ont été utilisées, elles présentent les séquences suivantes

Amorce 1: 5'-ATCTTGACATCCTCTGACC-3' SEQ ID N°:3

Amorce 2: 5'-TCGACGGCTAGCTCCAAAT-3' SEQ ID N°:4

Les cycles de température suivants ont été utilisés

30	1 fois	3 minutes	94 °C
		2 minutes	65 °C
	35 fois	1 minute	72 °C
		1 minute	94 °C
		2 minutes	65 °C
35	1 fois	5 minutes	72 °C

Protocole NASBA : la technique de NASBA suivie est celle décrite par Van der Vliet et al., J. Gen. Microbiol. 1993, 139 : 2423. Deux amorces d'amplification ont été utilisées, elles présentent les séquences 5 suivantes :

Amorce 1: 5'-GGTTTGTCAACGGCAGTCAACTTAGA-3'

Amorce 2: 5'-TCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCA-3'

10  $10 \mu\text{l}$  de lysat ou  $5 \mu\text{l}$  de lysat sont utilisés pour chaque essai PCR et NASBA, respectivement. Les amplicons produits par PCR sont observés sur gel d'agarose 0.8% et quantifiés sur Vidas selon le protocole décrit ci-dessus. Les amplicons produits après NASBA sont détectés et quantifiés sur microplaque par hybridation avec une sonde de capture et une sonde de détection spécifique de *S. epidermidis*, selon la méthode décrite par P. Cros et al., Lancet 1992, 240 : 870. La sonde de détection est couplée à la peroxidase de Raifort (HRP). Les deux sondes présentent les séquences suivantes :

Sonde de capture: 5'-GATAGAGTTTCCCCTTC-3' (SEQ ID 20 N°: 7)

Sonde de détection: 5'-GACATCCTCTGACCCCTC-3' (SEQ ID N°: 8)

Exemple 1 : Influence du diamètre des billes et du 25 coefficient a sur l'efficacité de la lyse par vortex

a- Influence du diamètre des billes.

Le protocole de lyse a été réalisé comme décrit 30 ci-dessus à partir d'une suspension initiale de *Staphylococcus epidermidis* ( $5.10^9$  cellules/ $300 \mu\text{l}$ ) en présence de  $90 \mu\text{l}$  de différents mélanges de billes caractérisées par des diamètres différents, pendant 2 minutes par essai. Les diamètres testés sont compris entre 35 1 et  $500 \mu\text{m}$ ; les mélanges testés sont les suivants :

A : microbilles de verre de diamètre compris entre 1 et 500 µm,

B : microbilles de verre de diamètre compris entre 50 et 100 µm,

5 C : microbilles de verre de diamètre compris entre 90 et 150 µm,

D : mélange homogène de billes de diamètre 100 µm,

E : mélange homogène de billes de zirconium de diamètre 100 µm.

10 F : mélange homogène de billes de zirconium de diamètre 500 µm

G : mélange (50/50 v/v) de billes de zirconium de diamètre 100 et 500 µm.

Comme l'indique la figure 1, la lyse cellulaire obtenue est la plus efficace en présence de billes de diamètre compris entre 90 et 150 µm, et de préférence égal à 100 µm. Les mesures de densité optique à 550nm des échantillons recueillis après 2 minutes de vortex dans ces conditions indiquent que le pourcentage de lyse de *S. epidermidis* est compris entre 60 et 70% avec ce diamètre de billes. Seule des différences négligeables de pourcentage de lyse sont observées en fonction de la nature des billes (verre ou zirconium) de même diamètre. Par contre l'utilisation de billes de diamètre inférieur ou supérieur à 90 jusqu'à 150 µm, telles les mélanges de billes de diamètre 1 à 50 µm, 50 à 100 µm, 100 à 500 µm, ou le mélange homogène de billes de diamètre 500 µm entraîne une diminution du pourcentage de lyse. L'analyse sur gel d'agarose 0,8% des acides nucléiques libérés dans les lysats, présentée dans la figure 2, montre que les molécules d'ADN et d'ARNr sont bien conservées puisque leur profil de migration sur gel d'agarose 0,8% est le même que celui des molécules d'ADN et ARNr bactériens purifiés et commercialisés. Les acides nucléiques relargués ont également le même profil de migration quel que soit le diamètre des billes utilisées pour la lyse

cellulaire. Les acides nucléiques libérés sont également détectables par analyse Vidas dont le protocole est décrit ci-dessus. Toujours d'après la figure 2, la quantité d'acides nucléiques libérés dans les lysats mesurée par 5 analyse Vidas reflète le pourcentage de lyse obtenu. En parallèle, il a été démontré que l'ADN ou l'ARNr 16S de chaque lysat peut être amplifié par protocole PCR ou NASBA spécifiques de *S. epidermidis*, qui sont décrits dans la partie protocole test general ci-dessus.

10

b- Influence du coefficient  $\alpha$

- tube Eppendorf

Le protocole de lyse a été réalisé en présence de 15 billes de diamètre 100  $\mu\text{m}$ , pendant 2 minutes. Des tubes Eppendorfs identiques ont été utilisés pour tous les essais. Le volume de la suspension bactérienne a été fixé à 300  $\mu\text{l}$  /tube pour chaque essai, et le volume de billes a varié entre 1 et 300  $\mu\text{l}/\text{tube}$ . Soit  $V_b$ , le volume apparent 20 des billes et  $V_e$ , le volume de l'échantillon liquide tel que  $V_b < V_e$  avec  $V_e = \alpha \cdot V_b$  avec  $\alpha$  étant un nombre réel positif différent de 0. Le coefficient  $\alpha$  a varié de 1 à 300. Après l'étape de vortex, les échantillons recueillis 25 sont analysés par mesure de densité optique à 550 nm, les acides nucléiques libérés dans le lysat sont observés sur gel d'agarose 0,8% et quantifiés par analyse Vidas.

La figure 3 indique que la lyse de *S. epidermidis* est efficace pour des valeurs du coefficient  $\alpha$  comprises entre 1,4 et 10 : le pourcentage de lyse est compris entre 30 30 et 70%. Pour des valeurs de  $\alpha < 1,4$ , le volume de billes étant trop important, le volume mort de la suspension cellulaire augmente de façon telle qu'il est impossible de récupérer le volume initial de la suspension cellulaire. Pour des valeurs de  $\alpha > 10$ , le volume de 35 billes est faible et la probabilité de rencontre et de choc mécanique entre billes et cellules est réduite. De

préférence la lyse cellulaire est plus efficace pour des valeurs de  $\alpha$  comprises entre 1,4 et 3,3 : le pourcentage de lyse étant compris entre 40 et 70%. L'analyse sur gel d'agarose 0,8% du lysat montre que les profils de migration des acides nucléiques libérés ne sont pas modifiés, quelles que soient les valeurs de  $\alpha$ . La quantité d'acides nucléiques mesurée par analyse Vidas est directement corrélée au pourcentage de lyse.

10 - tube Falcon

Une même étude a été réalisée en remplaçant les tubes Eppendorf par des tubes Falcon en polypropylène ( $V_c = 6\text{ml}$ ). La figure 4 indique que la lyse de *S. epidermidis* est efficace pour des valeurs du coefficient  $\alpha$  comprises entre 1,4 et 10 : le pourcentage de lyse est supérieur à 20%. De préférence, la lyse cellulaire est plus efficace pour des valeurs de  $\alpha$  comprises entre 1,4 et 3,3 : le pourcentage de lyse est compris entre 65 et 85%.

20 -forme disque

On a utilisé une carte de dimensions  $l = L = 8,5\text{cm}$  et  $h = 0,4 \text{ cm}$ . Un ou plusieurs trous, définis comme des trous, sont réalisés de hauteur constante et égale à la hauteur de la carte (soit 0,4 cm) et de diamètre constant. Ces trous sont recouverts d'un film de chaque côté, et chaque trou est rempli d'un mélange de billes de diamètre 100  $\mu\text{m}$  de volume apparent  $V_b$ , de 10 billes de fer de diamètre 2 mm et d'une suspension cellulaire de volume  $V_e$ . La carte ainsi définie est maintenue sur le vortex.

30 Le protocole de lyse a été réalisé pendant deux minutes. Des cartes telles que décrites ci-dessus avec un diamètre de 30 cm ( $V_c = 2,8 \text{ ml/trou}$ ) ont été utilisées pour chaque essai. Le volume de la suspension bactérienne a été fixée à 700  $\mu\text{l} / \text{trou}$  et le volume de billes a varié de 90 à 510  $\mu\text{l}/\text{trou}$ . Le coefficient  $\alpha$  a varié de 1,4 à 7,8. Après l'étape de vortex, le pourcentage de lyse des

échantillons recueillis a été analysé par mesure de densité optique à 550 nm, les acides nucléiques libérés ont été observés sur gel d'agarose et quantifiés par analyse Vidas.

5 La figure 5 indique le pourcentage de lyse obtenu en fonction du coefficient  $\alpha$ . La lyse de *S.epidermidis* est efficace avec un contenant format "carte" pour des valeurs du coefficient inférieures ou égales à 2,1 : lorsque  $\alpha$  est compris entre 1,4 et 2,1, le pourcentage de lyse est 10 compris entre 45% et 75%. De préférence, la valeur optimale du coefficient devrait être inférieure à 1,4 car même pour des valeurs de  $\alpha$  s'approchant de 1,4, les valeurs de pourcentage de lyse n'arrivent pas à un plateau. L'analyse sur gel d'agarose 0,8% du lysat montre 15 que les profils de migration nucléiques libérés ne sont pas modifiés quelles que soient les valeurs de  $\alpha$ . La quantité d'acide nucléique mesurée par analyse Vidas est directement corrélée au pourcentage de lyse.

20 Exemple 2 : influence du coefficient  $\beta$  sur l'efficacité de la lyse par vortex

- Tube Eppendorf

Le protocole de lyse a été réalisé en présence 25 d'un rapport constant entre le volume apparent de billes et le volume de l'échantillon liquide ( $\alpha = V_e/V_b = 3,3$ ) pendant 2 minutes. Le volume de la suspension bactérienne a varié entre 100  $\mu$ l et 1 ml. Soit  $V_e$ , le volume de l'échantillon liquide et  $V_c$ , le volume utile ou disponible 30 du contenant tel que  $V_e < V_c$  et  $V_c = \beta \cdot V_e$  avec  $\beta$  étant un nombre réel positif supérieur à 0, le coefficient  $\beta$  a varié de 1,5 à 15. Les expériences ont été réalisées en tube Eppendorf, soit  $V_c = 1,5\text{ml}$ . Après l'étape de vortex, les échantillons recueillis sont analysés par mesure de 35 densité optique à 550 nm, les acides nucléiques dans le

lysat sont observés sur gel d'agarose 0,8% et analysés par analyse Vidas.

Sur la figure 6 est indiqué le pourcentage de lyse obtenu en fonction du coefficient  $\beta$ . La lyse de *S. epidermidis* est plus efficace pour des valeurs du coefficient  $\beta$  compris entre 2,5 et 15 : le pourcentage de lyse est supérieur à 30%. Pour des valeurs de  $\beta$  inférieures à 2,5, les volumes de billes et d'échantillon liquide sont trop importants; ils limitent le mouvement des billes dans l'échantillon et le volume mort de l'échantillon augmente. Pour des valeurs de  $\beta$  supérieures à 15, le volume de l'échantillon est trop faible pour permettre une récupération complète du volume initial de la suspension cellulaire pour  $\alpha = 3,3$ . De préférence, l'efficacité de lyse cellulaire est meilleure pour des valeurs de  $\beta$  comprises entre 3,75 et 15 : le pourcentage de lyse est compris entre 35 et 60%; de préférence pour des valeurs comprises entre 7,5 et 15 (40 à 60% de lyse). L'analyse sur gel d'agarose 0,8% des lysats montre que les profils de migration des acides nucléiques libérés sont les mêmes quelles que soient les valeurs de  $\beta$ . Les quantités d'acides nucléiques mesurées par analyse Vidas sont directement corrélées aux pourcentages de lyse obtenus.

25

- tube Falcon

Une étude similaire a été réalisée en utilisant des tubes Falcon de polypropylène ( $V_c = 6\text{ml}$ ) à la place des tubes Eppendorf. Une même valeur du coefficient  $\alpha$  a été fixée ( $\alpha = 3,3$ ). Le volume de la suspension bactérienne a varié entre  $200 \mu\text{l}$  et  $2\text{ml}$ .  $\beta$  a varié de 3 à 30. La figure 7 illustre le pourcentage de lyse obtenu en fonction du coefficient  $\beta$ . La lyse de *S. epidermidis* est plus efficace pour des valeurs de  $\beta$  comprises entre 6 et 30 : le pourcentage de lyse est supérieur à 50%. Pour des valeurs de  $\beta > 30$ , le volume de l'échantillon est trop

faible pour permettre une récupération complète du volume initial de la suspension cellulaire, pour  $\alpha = 3,3$ . De préférence, l'efficacité de la lyse cellulaire est meilleure pour des valeurs de  $\beta$  comprises entre 12 et 30 : 5 le pourcentage de lyse est supérieur à 60%.

-forme disque

Le protocole de lyse a été réalisé avec le même contenant utilisé dans l'exemple 1 (diamètre des puits 30 10 mm,  $V_c = 2,8 \text{ ml}$ ), avec une valeur de coefficient  $\alpha$  ( $\alpha = 3,3$ ) pendant deux minutes. Le volume de la suspension bactérienne a varié de 300 à 700  $\mu\text{l}/\text{puits}$ . Le coefficient  $\beta$  a varié de 4 à 9,3. Après l'étape de vortex, le pourcentage de lyse des échantillons recueillis a été 15 analysé par mesure de densité optique à 550 nm, les acides nucléiques libérés ont été observés sur gel d'agarose et quantifiés par analyse Vidas.

Sur la figure 8 est indiqué le pourcentage de lyse obtenu en fonction du coefficient  $\beta$ . La lyse de 20 *S.epidermidis* est efficace en contenant "format carte" pour des valeurs de  $\beta$  supérieures ou égales à 9,3. Lorsque  $\beta$  est égal à 9,3 avec une valeur non optimale de  $\alpha$  ( $\alpha = 3,3$ ), 60% des cellules sont lysées. L'analyse sur gel d'agarose 0,8% du lysat montre que les profils de 25 migration des acides nucléiques libérés ne sont pas modifiés quelles que soient les valeurs de  $\beta$  et sont similaires à ceux décrits pour le format tube. La quantité d'acides nucléiques mesurée par analyse Vidas est corrélée au pourcentage de lyse pour chaque essai.

30

Exemple 3 : Influence de la géométrie du tube sur l'efficacité de la lyse par vortex

Le protocole de lyse a été réalisé dans des 35 contenants de différentes géométries et différents volumes ( $V_c$ ), en présence de 300  $\mu\text{l}$  de suspension cellulaire et 90

$\mu$ l de billes de diamètre 100  $\mu$ m pendant 2 minutes (soit  $\alpha$  = 3,3 et  $\beta$  variable).

A : tube Eppendorf en polypropylène à fond en forme de V,  $V_c$  = 1,5 ml

5 B : cuvette de spectrométrie en polypropylène à fond plat,  $V_c$  = 5 ml

C : tube à fond plat,  $V_c$  = 30 ml

D : tube à fond plat,  $V_t$  = 60 ml

E = bouteille de verre à fond plat,  $V_c$  = 8 ml

10 F = bouteille de verre à fond plat,  $V_c$  = 25 ml

G = tube en polystyrène à fond en forme de U,  $V_c$  = 6 ml

H = tube en polystyrène à fond en forme de U,  $V_c$  = 14 ml

15 I = tube en polystyrène à fond en forme de U,  $V_c$  = 22 ml

J = tube en polypropylène à fond en forme de U,  $V_c$  = 6 ml

K = tube en polypropylène à fond en forme de U,  $V_c$  = 14 ml

L = tube en polypropylène à fond en forme de U,  $V_c$  = 22 ml

M = tube en polypropylène à fond en forme de U,  $V_t$  = 4 ml.

La figure 9 indique le pourcentage de lyse obtenu en fonction de la géométrie du contenant utilisé. Le pourcentage de lyse est compris en moyenne entre 60 et 75% avec les tubes à fond plat ou à fond en forme de V, par contre il est compris en moyenne entre 70 et 80% avec les tubes à fond en forme de U pour un même temps de vortex et une même valeur de  $\alpha$ . La mesure par analyse Vidas de la quantité d'acides nucléiques libérés confirme cette influence.

30

Exemple 4 : influence de l'ajout de billes de plus gros diamètre sur l'efficacité de la lyse par vortex

Le protocole de lyse a été réalisé en tube Eppendorf, en présence de 300  $\mu$ l de suspension cellulaire et 90  $\mu$ l de billes de diamètre 100  $\mu$ m (soit  $\alpha = 3,3$  et  $\beta = 5$ ) pendant deux minutes. Différentes billes ont été ajoutées au milieu en combinaison : billes de fer de diamètre 2 mm, billes de verre de diamètre 3 mm.

La figure 10 présente le pourcentage de lyse de *S.epidermidis* en fonction des différentes combinaisons de billes ajoutées. L'addition de bille de fer ou de billes de verre entraîne une augmentation du pourcentage de lyse. Ce pourcentage est sensiblement meilleur en présence de jusqu'à 10 billes/tube. La présence de ces 10 billes ne gêne pas le mouvement des billes de diamètre 100  $\mu$ m; par contre au delà de cette valeur, le mouvement est gêné. Le pourcentage de lyse obtenu est plus élevé en présence d'un même nombre de billes de verre par essai que de billes de fer. D'après la figure 11, l'addition de combinaison de billes de fer et de verre permet d'obtenir un pourcentage de lyse aussi élevés qu'en présence de l'addition d'un mélange homogène de billes pour chaque combinaison testée; le pourcentage de lyse est supérieur à 80%. L'analyse sur gel d'agarose 0,8% des acides nucléiques libérés montre que les molécules d'ADN et d'ARNr ont le même profil de migration après lyse quelles que soient les combinaisons des billes utilisées. L'addition des billes de fer et de verre n'altère pas la structure du matériel nucléique libéré. De plus il a été vérifié que leur présence dans le lysat ne perturbe pas les réactions d'amplification PCR et NASBA.

Exemple 5 : Influence du temps de vortex sur l'efficacité de la lyse par vortex

Trois protocoles de lyse ont été réalisés en parallèle :

- Protocole I : tube Eppendorf Vc = 1,5 ml, 90  $\mu$ l de bille de diamètre 100  $\mu$ m et 300  $\mu$ l de suspension cellulaire  $\alpha = 3,3$  et  $\beta = 5$ ).

5 - Protocole II : protocole I avec addition de 3 billes de verre de diamètre 3 mm et 5 billes de fer de diamètre 2 mm.

- Protocole III : protocole II en tube Falcon (Vc = 6ml) à la place des Eppendorfs.

Pour chaque protocole, différents temps de vortex 10 ont été réalisés.

La figure 12 présente le pourcentage de lyse obtenu en fonction du temps de vortex, pour les protocoles I et II. Les conditions expérimentales du protocole I ne sont pas optimales. On confirme qu'après 2 minutes de 15 vortex, seulement 60% des bactéries *S. epidermidis* sont lysées. Par contre il est possible d'améliorer l'efficacité du protocole malgré ces conditions non optimales en augmentant le temps de vortex : dès 8 minutes de vortex, 85% des bactéries sont lysées. Les conditions 20 expérimentales du protocole II sont plus optimales que celles du protocole I, dû à l'addition de billes de diamètre 3 mm : dans ces conditions, 85% des bactéries *S. epidermidis* sont lysées dès 4 minutes de vortex.

La figure 13 présente le pourcentage de lyse 25 obtenu en fonction du temps de vortex pour les protocoles II et III. Les conditions expérimentales du protocole III sont plus optimales que celles du protocole II : 88% des bactéries *S. epidermidis* sont lysées après seulement 2 minutes de vortex alors que seulement 80% ou 60% des 30 bactéries après 2 minutes avec le protocole II ou I, respectivement. La mesure par analyse Vidas des acides nucléiques libérés confirme ces principales observations.

Ainsi, augmenter le temps de vortex permet d'obtenir un pourcentage de lyse élevé lorsque les 35 conditions expérimentales initiales ne sont pas optimales

.Parallèlement, lorsque ces conditions sont optimales, le temps de vortex peut être court (2 minutes).

Exemple 6 : Universalité du protocole de lyse

5 selon l'invention

Le procédé de lyse selon l'invention peut être appliqué à d'autres espèces cellulaires. Pour cela, le protocole a été réalisé en tube Eppendorf en présence de 300  $\mu$ l de suspension cellulaire de concentration  $1.10^9$  10 cellules /ml, de 90  $\mu$ l de billes de diamètre 100  $\mu$ m avec un temps de vortex égal à 8 minutes. Différentes cellules ont été respectivement utilisées (*Mycobacterium gordonae*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus stearothermophilus*, *Micrococcus sp.*, 15 *Actinomyces viscosus*, *Actinomyces naeslundii*, *Stomatococcus mucilaginosus*, *Nocardia asteroides*, *Rhodococcus sp.*). Les résultats obtenus indiquent que le pourcentage de lyse pour chacun des cas analysés est compris entre 80 et 90%. Les profils de migration sur gel 20 d'agarose 0,8% des acides nucléiques libérés dans chaque lysat sont similaires pour chaque souche bactérienne testée, et sont similaires à celui d'ADN et ARNR 16S d'*E. coli* purifiés et commercialisés.

25 Exemple 7 : Lyse de levure

Espèce testée: *Candida albicans*

Contenant: Tube Falcon en polypropylène de Vc = 6 ml.

30 Echantillon ajusté à 0.5 McFarland, soit  $3.10^6$  levures/ml.

Volume échantillon: Ve = 600  $\mu$ l

Volume apparent des billes: Vb ( $\mu$ l, variable): 60, 90 et 180  $\mu$ l.

35 Diamètre des billes en verre testées ( $\mu$ ): 100, 500 et 1500  $\mu$ m.

27

L'efficacité de lyse est mesurée d'après le pourcentage de lyse:

$$\% \text{ de lyse} = D0550 \text{ (avant lyse)} - D0550 \text{ (après lyse)} / D0550 \text{ (avant lyse)}$$

5 Durée du vortex: 2 à 20 mn

### Résultats

Diamètre billes	( $\mu$ ) Vb ( $\mu$ l)	Durée du vortex (mn)	% de lyse
100	90	2	0
100	90	8	0
1500	90	2	0
1500	90	8	30
1500	90	20	36

On démontre qu'un diamètre de 100  $\mu\text{m}$  est 10 insuffisant.

Diamètre billes ( $\mu$ )	Vb ( $\mu$ l)	Durée du vortex (mn)	% de lyse
1500	180	8	30
1500	180	20	29
1500	60	8	33

On démontre qu'avec un diamètre de billes de 1500  $\mu\text{m}$ , on atteint un pourcentage de lyse d'environ 30%, pour 15 un Vb compris entre 60 et 180 et avec une durée de vortex entre 8 et 20mn.

Diamètre billes ( $\mu$ )	Vb ( $\mu$ l)	Durée du vortex (mn)	% de lyse
500	60	8	52
500	60	20	58
500	180	20	71

On démontre qu'un diamètre de  $500\mu$  permet d'obtenir un pourcentage de lyse de plus de 50%, avec un Vb de 60 à  $180\mu$ l et une durée de vortex de 8 à 20mn.

##### 5 Conclusion:

Des billes de  $500\mu$ m de diamètre, avec une durée de vortex comprise entre 8 et 20 mn sont nécessaires comme paramètre en combinaison avec le mouvement de type Vortex pour lyser des levures.

10

##### Exemple 8 : Sensibilité du protocole de lyse selon l'invention

Les acides nucléiques ADN et ARNr 16S libérés par lyse selon le procédé de l'invention ont été soumis à une 15 amplification. Les conditions de lyse sont les mêmes que celles indiquées dans l'exemple 6. La souche bactérienne utilisée est *S. epidermidis*. Deux protocoles d'amplification spécifiques des acides nucléiques de *S. epidermidis* ont été réalisés à partir des lysats 20 recueillis, soit un protocole PCR pour l'amplification de l'ADN, soit une protocole NASBA pour l'amplification de l'ARNr 16S, comme décrits ci-dessus dans le protocole test général.

##### 1) - Amplification PCR de l'ADN libéré

25

Des concentrations initiales de  $1 \cdot 10^9$  à  $1 \cdot 10^2$  cellules /ml ont été utilisées. 10  $\mu$ l de lysat ont été utilisés pour chaque essai PCR. Les amplicons produits ont

été détectés et quantifiés après hybridation sandwich spécifique sur Vidas, comme décrit dans le protocole test général. Les amplicons produits sont mesurables pour des concentrations bactériennes initiales au moins supérieures 5 ou égales à  $1.10^2$  cellules /ml, soit 30 cellules /300 µl. Ainsi le protocole de lyse optimisé par vortex est efficace pour lyser au moins 30 cellules /300 µl et pour libérer des molécules d'ADN amplifiables par PCR de sorte que la quantité d'amplicons produits soit détectables.

10

#### 2)- Amplification NASBA de l'ARNr 16S

Des concentrations initiales de  $2.10^9$  à  $2.10^2$  cellules /ml ont été utilisées. 5 µl de lysat ont été utilisés pour chaque essai NASBA. Les amplicons produits 15 ont été détectés et quantifiés sur microplaques par hybridation sandwich avec des sondes oligonucléotidiques spécifiques de *S. epidermidis*, comme décrit dans le protocole test général. Les amplicons produits ont pu être détectés et mesurés pour des concentrations bactériennes 20 initiales au moins supérieures ou égales à  $2.10^2$  cellules /ml, soit 60 cellules /300 µl. La quantité d'amplicons mesurée est importante pour cette concentration initiale, ce qui indique que probablement des amplicons produits après lyse de bactéries de concentration initiale 25 inférieure à 60 cellules /300 µl seraient détectables et mesurables.

#### Exemple 9 : Résolution de la formation de mousse issue de l'agitation de billes dans un échantillon.

A des fins d'automatisation, il est capital de 30 résoudre et d'empêcher la formation de mousse dans les liquides, ce qui perturbe voire empêche les étapes de transfert par pipettage. Des agents " antimousse " ont été étudiés quant à leur capacité à limiter ce type de phénomène. Pour ce faire, un protocole a été validé à

partir d'échantillons respiratoires (crachats, expectorations, lavages broncho-alvéolaires) fluidifiés et inactivés selon le protocole "NaLc". Brièvement, 2 ml d'échantillon sont ajoutés à 2 ml de solution antiseptique (obtenue par dissolution de 0,75 g de N-actétyl-L-Cystéine dans 150 ml de soude 4%). Le mélange est vortexé et laissé sous agitation pendant 20 minutes à température ambiante, puis neutralisé par 41 ml de tampon phosphate (pH 6,8). L'ensemble est vortexé 15 secondes puis centrifugé à 4°C pendant 25 minutes à 4000 g. Le culot est resuspendu (vortex, 15 secondes) dans 2 ml résiduels après avoir éliminé le surnageant.

Différents échantillons sont ensuite mélangés afin de disposer d'un milieu homogène et constant pour l'étude. Les essais sont réalisés de la manière suivante : 260 µl d'échantillons sont ajoutés dans un tube polypropylène 12 x 75 mm avec 90 µl de billes de verre de diamètre 100 µm, 3 billes de verre de diamètre 2 mm, 5 billes de fer de diamètre 2 mm. 40 µl d'un détergent anionique sont ajoutés afin d'obtenir une concentration finale de 2,5 %. La présence d'un détergent est justifiée par le fait de stabiliser et de protéger les acides nucléiques lors du processus de lyse.

L'ensemble est agité dans un vortex Reax 2000 (Heidolph) à la puissance maximale pendant 12 minutes (temps particulièrement long par rapport au protocole standard, mais qui doit favoriser la formation éventuelle de mousse le cas échéant). La hauteur du liquide dans le tube est mesurée initialement puis après agitation et le pourcentage de mousse obtenu est exprimé dans les résultats suivants en faisant le rapport de la hauteur de mousse sur la hauteur initiale.

Concentration antimousse (%)	Génération de mousse (%)
0	22 %
0.01	11 %
0.03	11 %
0.1	11 %
0.5	0 %
1 %	0 %

L'agent antimousse, en particulier le Foam Ban MS-575 (Ultra Inc., Charlotte, USA) est ajouté sous un volume négligeable, afin d'obtenir des concentrations finales de 5 0,01 à 1 % (*Tableau N*).

Les résultats (voir *Tableau N*) montrent que la présence d'un antimousse permet la résolution de la formation de mousse, notamment à partir d'échantillons cliniques tels que les sédiments. Son utilisation à une 10 concentration de 0,5 à 1 % permet de résoudre totalement la formation de mousse issue de l'agitation de l'échantillon liquide en présence de billes.

L'efficacité de l'antimousse a également été vérifiée à partir d'échantillons individuels (non 15 mélangés), à la concentration finale de 0,6 %, selon le protocole décrit précédemment.

Les résultats (voir *Tableau N+1*) montrent que la genèse de mousse est variable selon les échantillons biologiques, mais que la présence d'antimousse au sein du

protocole de lyse, résout et empêche la formation de mousse à partir de différents échantillons respiratoires.

Tableau N + 1

Echantillon	Génération de mousse (%)	
	avec mousse	sans mousse
2675 6/2	0%	16%
2677 6/2	0%	16%
2654 6/2	0%	16%
2673 6/2	0%	22%
3609 71	0%	11%
3673 92	0%	16%

5

Exemple 10 :Sensibilité du protocole de lyse de microorganismes en présence d'agents antimousse

L'efficacité de l'ensemble du protocole de lyse, notamment en présence d'antimousse, a été évaluée sur des échantillons contenant de très faibles concentrations de bactéries. La bactéries *Mycobacterium bovis BCG* a été utilisée, car le genre *Mycobacterium* est connu comme étant difficile à lyser, et particulièrement recherché dans les prélèvements respiratoires.

Des dilutions en cascade, à partir d'une suspension initiale homogène de bactéries dont la concentration a été déterminée par mesure densitométrique (Densité Optique à 550 nm) ont été réalisées afin d'inoculer sous un volume négligeable des fractions de sédiment négatif (reconstitué par mélange de différents

sédiments négatifs fluidifiés et décontaminés) inactivé (chauffage à 95°C pendant 15 minutes). Les échantillons ainsi reconstitués ont été soumis au protocole suivant :

· dilution dans un tampon contenant un détergent  
5 anionique et de l'antimousse Foam Ban MS-575 pour obtenir des concentrations de 2,5 % et 1% final, respectivement.

· chauffage à 95°C pendant 15 mn (inactivation des bactéries).

· un volume de 600 µl est ajouté dans la cuve 12 x  
10 75 mm (polypropylène) contenant 180 µl de billes de verre de 100 µm, 6 billes de verre (diamètre 2 mm), 10 billes de fer (diamètre 2 mm) et l'ensemble est agité à l'aide d'un vortex pendant 2 minutes à la puissance maximale.

En parallèle, des témoins d'expériences sont  
15 réalisés : ceux-ci subissent le même protocole que précédemment décrit hormis l'étape de d'agitation des billes par vortex.

Les acides nucléiques ainsi potentiellement libérés sont alors purifiés par une étape de capture  
20 spécifique sur des billes magnétiques (Seradyne) dérivées avec un oligonucléotide de capture complémentaire de la séquence de l'ARN 16S de *M. tuberculosis* BCG, selon le protocole suivant :

· 250 µl de lysat obtenu sont mélangés à un tampon  
25 de capture contenant les sondes oligonucléotidiques couplées à des billes magnétiques (50 µg/essai). L'ensemble est incubé 20 mn à 60°C, puis 10 mn à température ambiante, puis le surnageant est éliminé après immobilisation des billes sur les parois du tube par  
30 aimantation.

les billes sont lavées (resuspension puis aimantation) par 2 fractions de 1 ml de tampon de lavage.

après élimination du tampon, les billes sont resuspendues par 50 µl d'eau et 25 µl du mélange  
5 d'amplification contenant des amorces oligonucléotidiques et des désoxyribonucléotides de la trousse d'identification de *M. tuberculosis* ("Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct", Gen-Probe ref. 1001), qui est basé sur la "Transcription-Mediated Amplification"  
10 (TMA), décrite par McDonough et coll. (Nucleic Acids Amplification Technologies, 1997, Ed. Lee, Morse & Olsvik, Eaton Publishing, Natik, USA, pp. 113-123) ainsi que Kacian et Fulz (Nucleic Acid Sequences Amplification Methods, 1995, Brevet des Etats Unis d'Amérique, N;  
15 5,399,491).

l'ensemble est chauffé à 60°C pendant 15 mn, refroidi à 42°C pendant 5 mn, et 25 µl de la solution enzymatique de la trousse (contenant de l'ARN polymérase T7 et de la reverse-transcriptase) sont ajoutés.

20 la réaction est incubée pendant 1 heure à 42°C, puis analysée en utilisant les réactifs de détection de la trousse, suivant la technique "Hybridization Protection Assay" (HPA) décrite par Arnold et coll. (Clin. Chem., 1989, vol. 35, pp. 1588-1594).

25 Les réactions sont ensuite lue sur un luminomètre 450 i (Gen-Probe) et aboutissent à des données en unités de luminescence relatives (RLU), la limite de positivité d'un essai étant 30000 RLU.

Les données obtenues sont indiquées dans le  
30 tableau N+2, et correspondent à trois essais expérimentaux par conditions testées.

Tableau N + 2

Bactéries/ essai	10 Exp - 3	10 Exp - 1	10 Exp + 1	10 Exp + 3	
Sans Vortex	415	402	508	119736	
	467	554	422	2312	
	371	364	179756	1013140	
	418	440	60229	378396	Moyenne
	48	101	103514	552831	Ecart Type
	12	23	172	146	Coefficient de variation (%)
Avec Vortex	43117	457	1029901	1079399	
	1088	919609	125	1030602	
	389	453	1069273	1058371	
	144198	306840	700100	1056124	Moyenne
	248479	530674	605650	24476	Ecart Type
	172	173	87	2	Coefficient de variation (%)

Les résultats (voir Tableau N+2) montrent que la réalisation du protocole de lyse par billes de verre en présence d'agents antimousse permet de détecter dans les 5 échantillons biologiques une quantité équivalente à  $10^{-3}$  bactéries/essai, soit une quantité équivalente à 1 à 10 copies de ribosomes de manière sensible. En comparaison, l'absence de lyse (sauf chauffage initial en présence de détergent pour l'inactivation des échantillons) ne peut 10 détecter que l'équivalent de 10 à 1000 bactéries par essai, soit 10 000 fois moins qu'avec la méthode de lyse utilisée.

36

Ces résultats montrent la validité du protocole associant la lyse de bactéries par choc mécanique en présence de billes (à l'aide d'un vortex ou autre) combinée à l'utilisation d'agents antimousse. La 5 combinaison d'un procédé de lyse par agitation de billes est donc parfaitement adaptée.

10

15

20

25

30

## REVENDICATIONS

1. Procédé de lyse d'un échantillon biologique comprenant au moins un micro-organisme de type bactérie, 5 pour libérer au moins un matériel nucléique d'intérêt appartenant audit micro-organisme, selon lequel:

- on dispose dans un contenant ledit échantillon biologique en milieu liquide,

10 matériau particulaire, relativement dur, et substantiellement inerte par rapport au matériel nucléique,

- on soumet le mélange de l'échantillon biologique et du matériau particulaire à un mouvement,

15 caractérisé en ce que, en combinaison:

le mouvement choisi est de type vortex, et répond aux conditions suivantes:

- le matériau particulaire est constitué de billes de diamètre compris entre 90 et 150  $\mu\text{m}$ , et

20 - le volume apparent des billes,  $V_b$ , et le volume de l'échantillon liquide,  $V_e$ , sont liés par la relation  $V_e = \alpha \cdot V_b$ , avec  $\alpha$  compris entre 1,4 et 10 lorsque le contenant est de forme tubulaire, et  $\alpha$  inférieur ou égal à 2,1 lorsque le contenant est de forme disque,

25 moyennant quoi, sans ajout de réactif et/ou étape opératoire supplémentaire, on libère directement dans le milieu liquide le matériel nucléique à l'état natif et accessible à tout réactif de traitement postérieur.

30 2. Procédé de lyse d'un échantillon biologique comprenant au moins un micro-organisme de type levure, pour libérer au moins un matériel nucléique d'intérêt appartenant audit micro-organisme, selon lequel:

35 - on dispose dans un contenant ledit échantillon biologique en milieu liquide,

- on dispose dans ledit contenant au moins un matériau particulaire, relativement dur, et substantiellement inerte par rapport au matériel nucléique,

5 - on soumet le mélange de l'échantillon biologique et du matériau particulaire à un mouvement,

caractérisé en ce que, en combinaison:

le mouvement choisi est de type vortex, et répond aux conditions suivantes:

10 - le matériau particulaire est constitué de billes ayant un diamètre d'environ 500 µm, et

- le volume apparent des billes , V<sub>b</sub>, et le volume de l'échantillon liquide, V<sub>e</sub>, sont liés par la relation V<sub>e</sub> = α.V<sub>b</sub>, avec α compris entre 1,4 et 10 lorsque le 15 contenant est de forme tubulaire, et α inférieur ou égal à 2,1 lorsque le contenant est de forme disque,

moyennant quoi, sans ajout de réactif et/ou étape opératoire supplémentaire, on libère dans le milieu liquide le matériel nucléique à l'état natif et accessible 20 à tout réactif de traitement postérieur.

3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le matériau particulaire est constitué de billes ayant un diamètre d'environ 100 µm.

25

4. Procédé selon les revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que le mouvement de type vortex répond en outre à la relation suivante:

V<sub>b</sub> < V<sub>e</sub> < V<sub>c</sub>, selon laquelle

V<sub>c</sub> = β.V<sub>e</sub>, et

30 β est supérieur ou égal à 2,5, V<sub>c</sub> étant le volume utile du contenant.

5. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que le contenant est de forme tubulaire, 35 de préférence à fond en forme de U.

6. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que  $\beta$  est un nombre compris entre 2,5 et 30.

5 7. Procédé selon les revendications 1 ou 2, 4 et 5, caractérisé en ce que le contenant est un tube à fond tronconique, et  $\alpha$  est un nombre compris entre 1,4 et 3,3, et  $\beta$  est un nombre compris entre 2,5 et 15, de préférence entre 3,75 et 15.

10

8. Procédé selon les revendications 1 ou, 4 et 2 et 5, caractérisé en ce que le contenant est un tube à fond en forme de U, et  $\alpha$  est un nombre compris entre 1,4 et 3,3, de préférence est égal à 3,3, et  $\beta$  est un nombre 15 compris entre 3 et 30, de préférence entre 12 et 30, par exemple égal à 20.

9. Procédé selon la revendication 1 ou 2, et 4 caractérisé en ce que le contenant est sous forme disque 20 et  $\alpha$  est inférieur ou égal à 1,4 et  $\beta$  est supérieur ou égal à 9,3.

10. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que le matériau particulaire comprend 25 d'autres billes de diamètre supérieur à celui desdites billes.

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que le contenant comprend jusqu'à y compris 16 30 autres billes, de préférence jusqu'à y compris 10 autres billes, ayant un diamètre égal à environ de 2 à 3 mm..

12. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que l'on ajoute une substance anti- 35 mousse à une concentration finale de 0,01 à 1%, de

préférence de 0,5 à 1% du volume de l'échantillon liquide, Ve.

13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé  
5 en ce que l'on ajoute en outre un détergent de type  
anionique à une concentration finale de 2,5% du volume de  
l'échantillon liquide, Ve.

14. Procédé selon la revendication 1 caractérisé  
10 en ce que le temps de mise en mouvement de type vortex est  
au moins égal à 10 secondes, de préférence au moins égal à  
20 secondes, par exemple entre 1 et 5 minutes.

15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé  
15 en ce que le temps de mise en mouvement de type vortex est  
d'environ 2 minutes.

16. Procédé selon la revendication 2 caractérisé  
en ce que le temps de mise en mouvement de type vortex est  
20 compris entre 8 et 20 minutes.

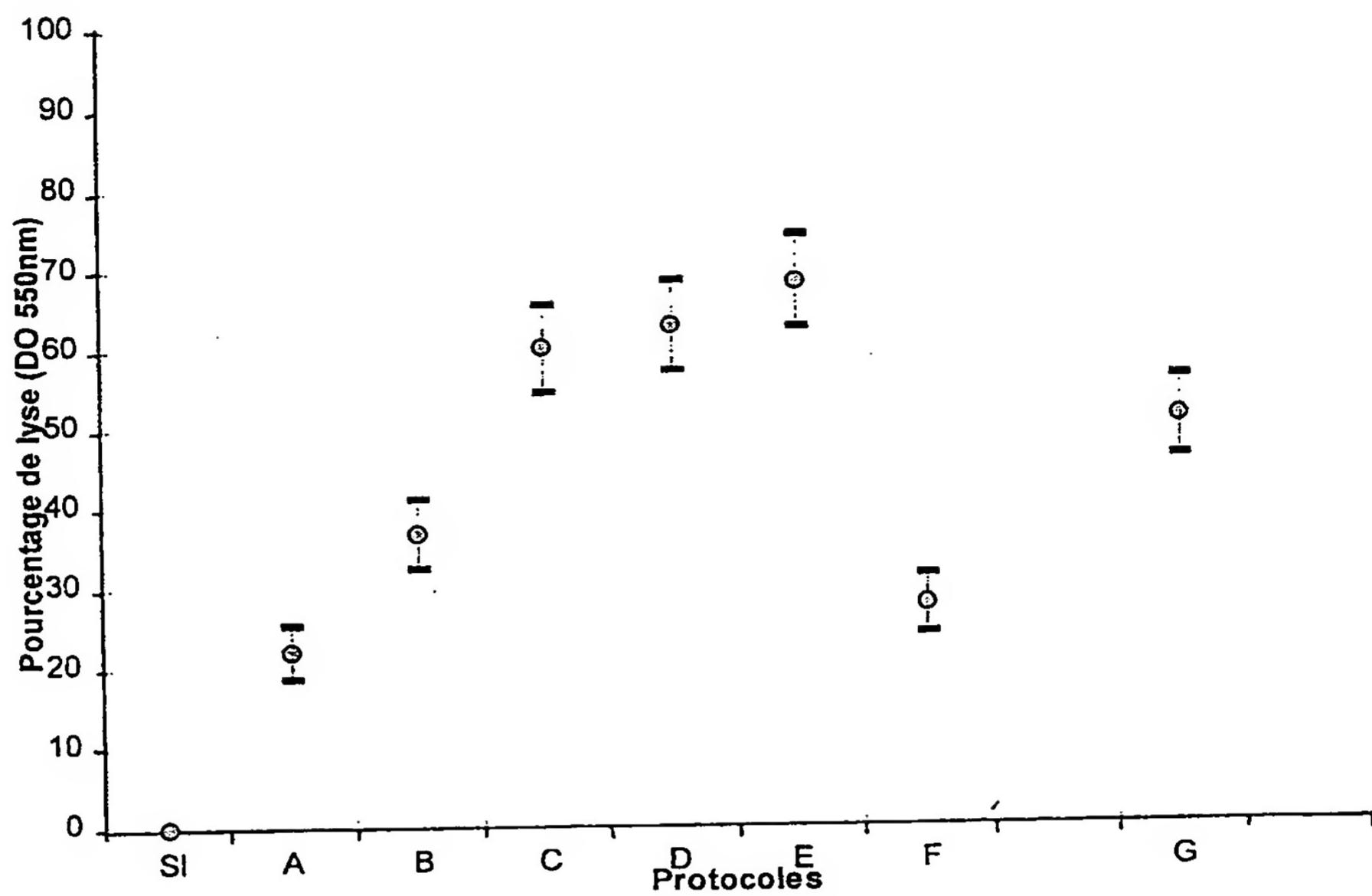
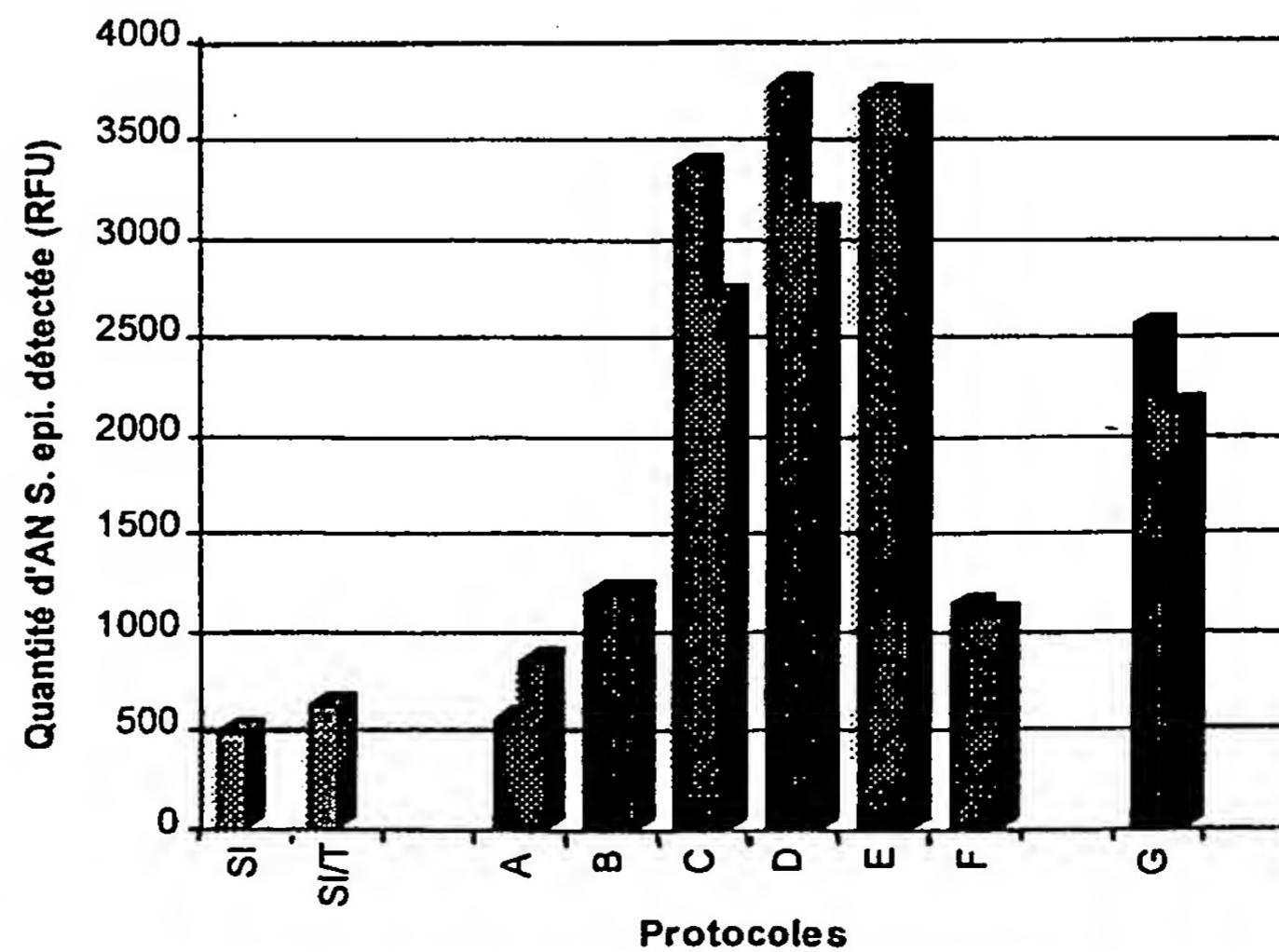
17. Procédé de traitement d'un échantillon  
biologique comprenant au moins un micro-organisme de type  
bactérie ou levure, comportant un matériel nucléique  
25 d'intérêt, selon lequel:

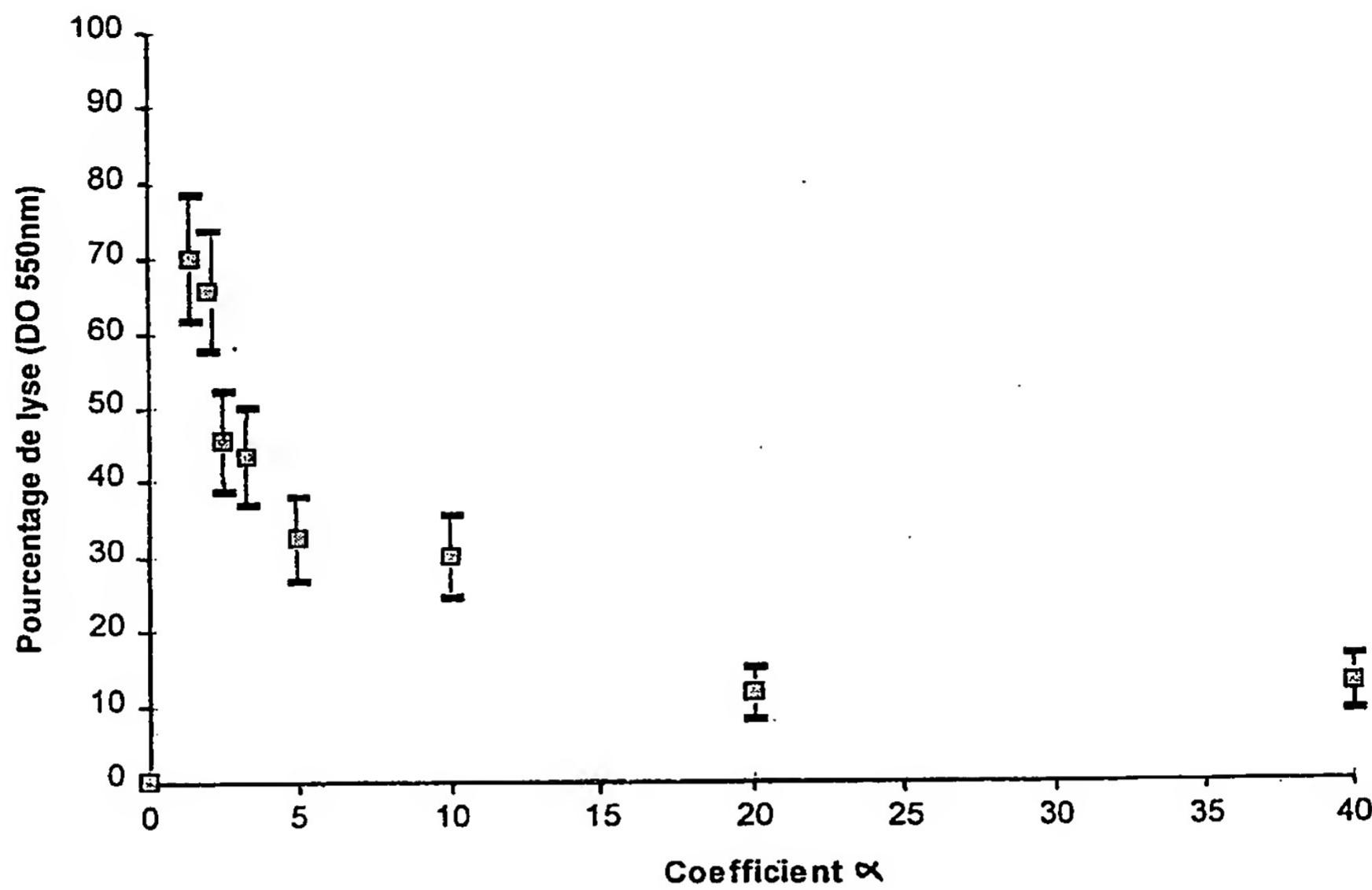
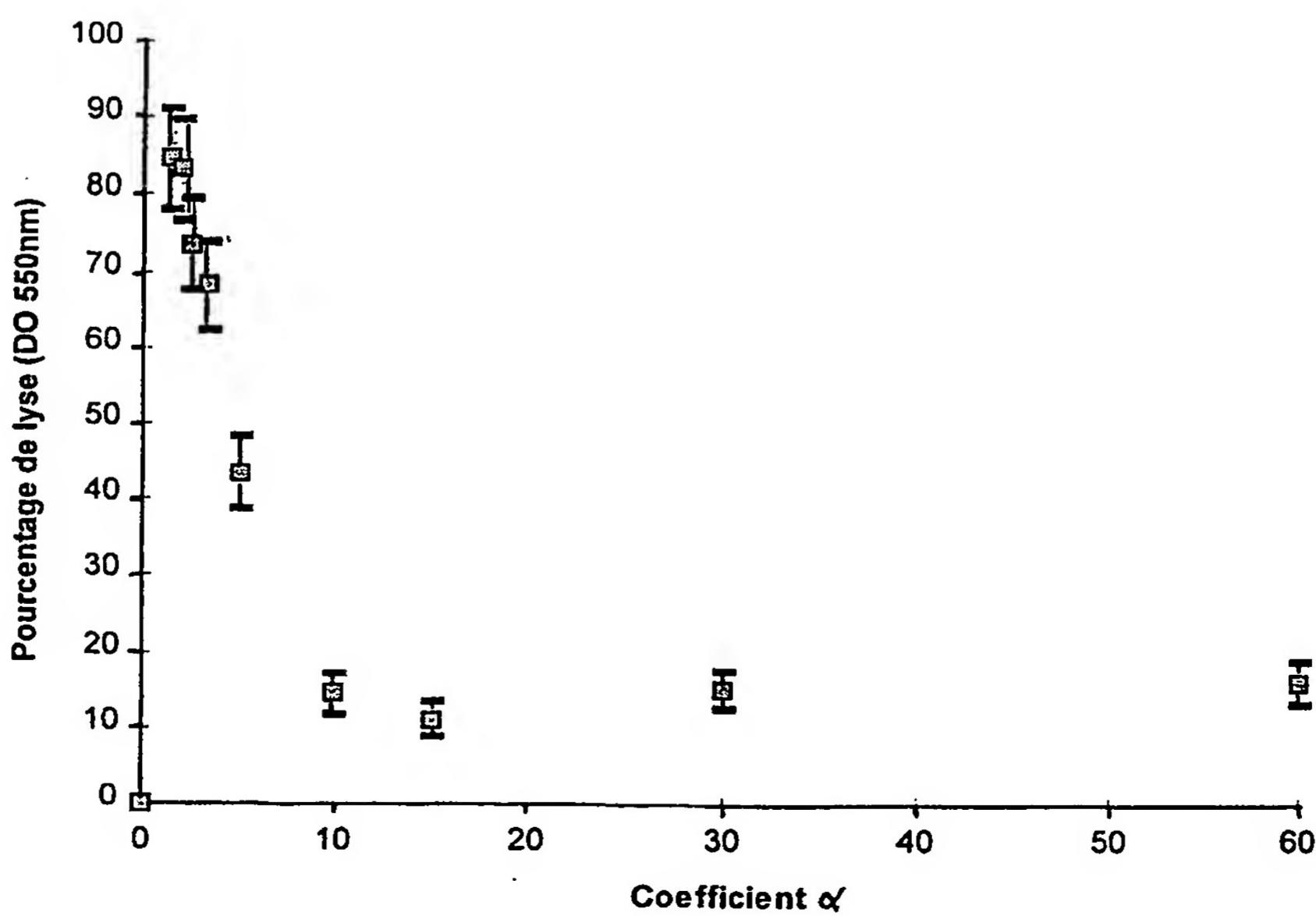
- on procède à une lyse dudit échantillon, selon  
le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à  
16,

- on soumet l'échantillon biologique lysé, avec ou  
30 sans le matériau particulaire ayant servi à la lyse,  
directement à un protocole opératoire concernant  
spécifiquement le matériel nucléique d'intérêt, par  
exemple amplification ou détection nucléique.

35 18. Contenant à usage unique, pour la mise en  
œuvre d'un procédé selon l'une quelconque des

revendications 1 à 16, caractérisé en ce qu'il comprend une charge d'un matériau particulaire adaptée, en fonction d'un volume prédéterminé de l'échantillon biologique, à la mise en oeuvre directe du procédé selon l'une quelconque  
5 des revendications 1 à 15.

**FIGURE 1****FIGURE 2**

**FIGURE 3****FIGURE 4**

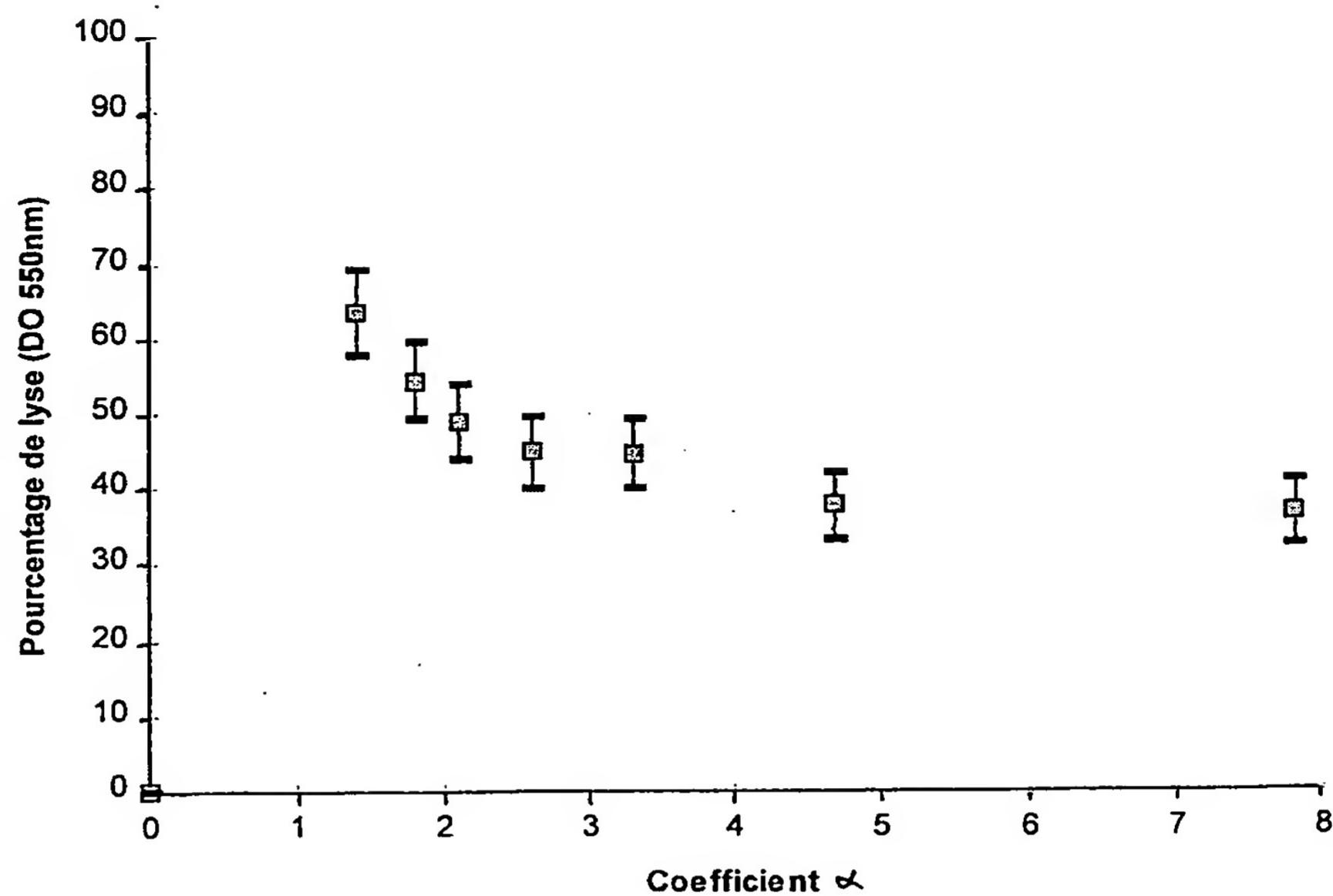
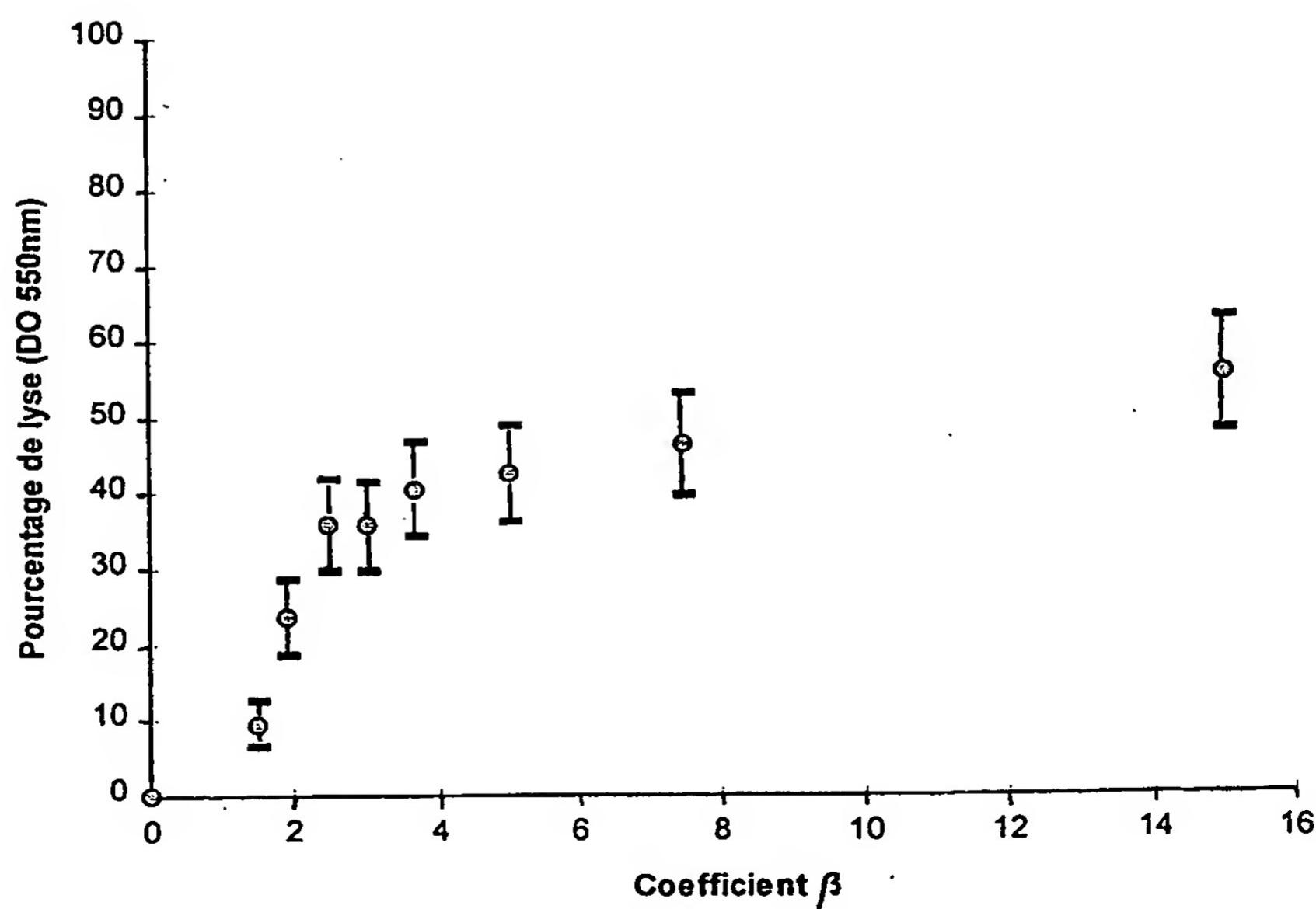
**FIGURE 5****FIGURE 6**

FIGURE 7

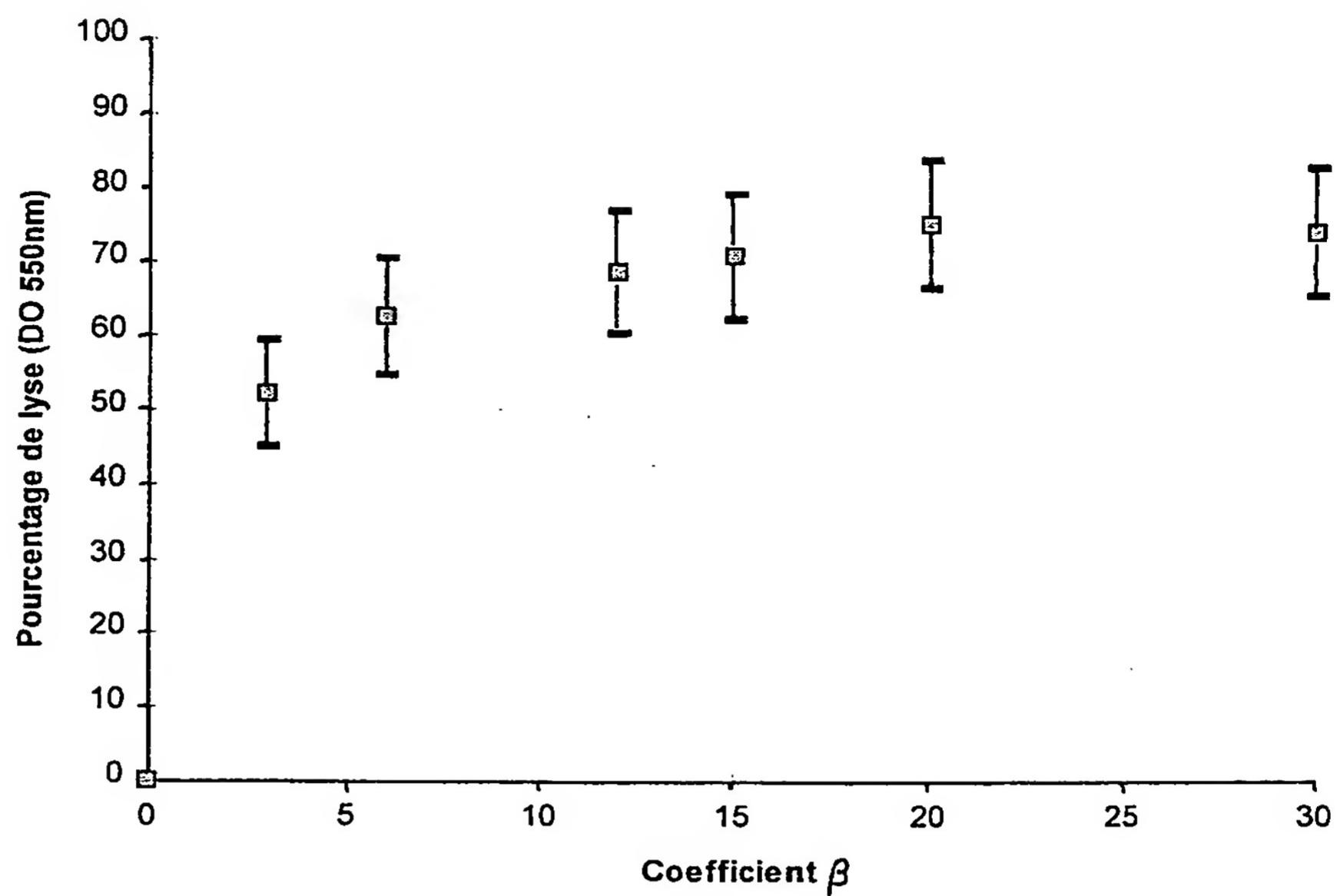
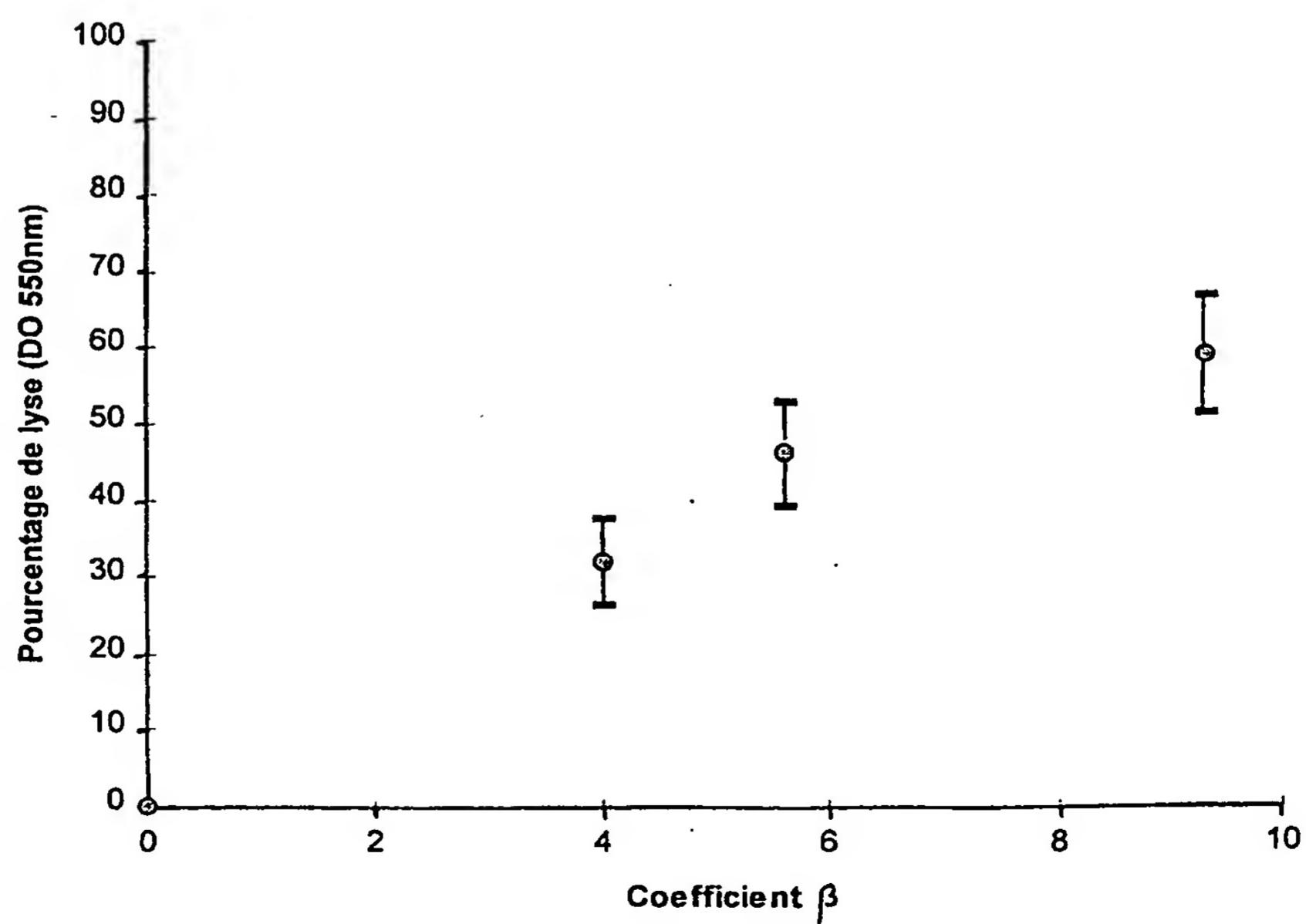
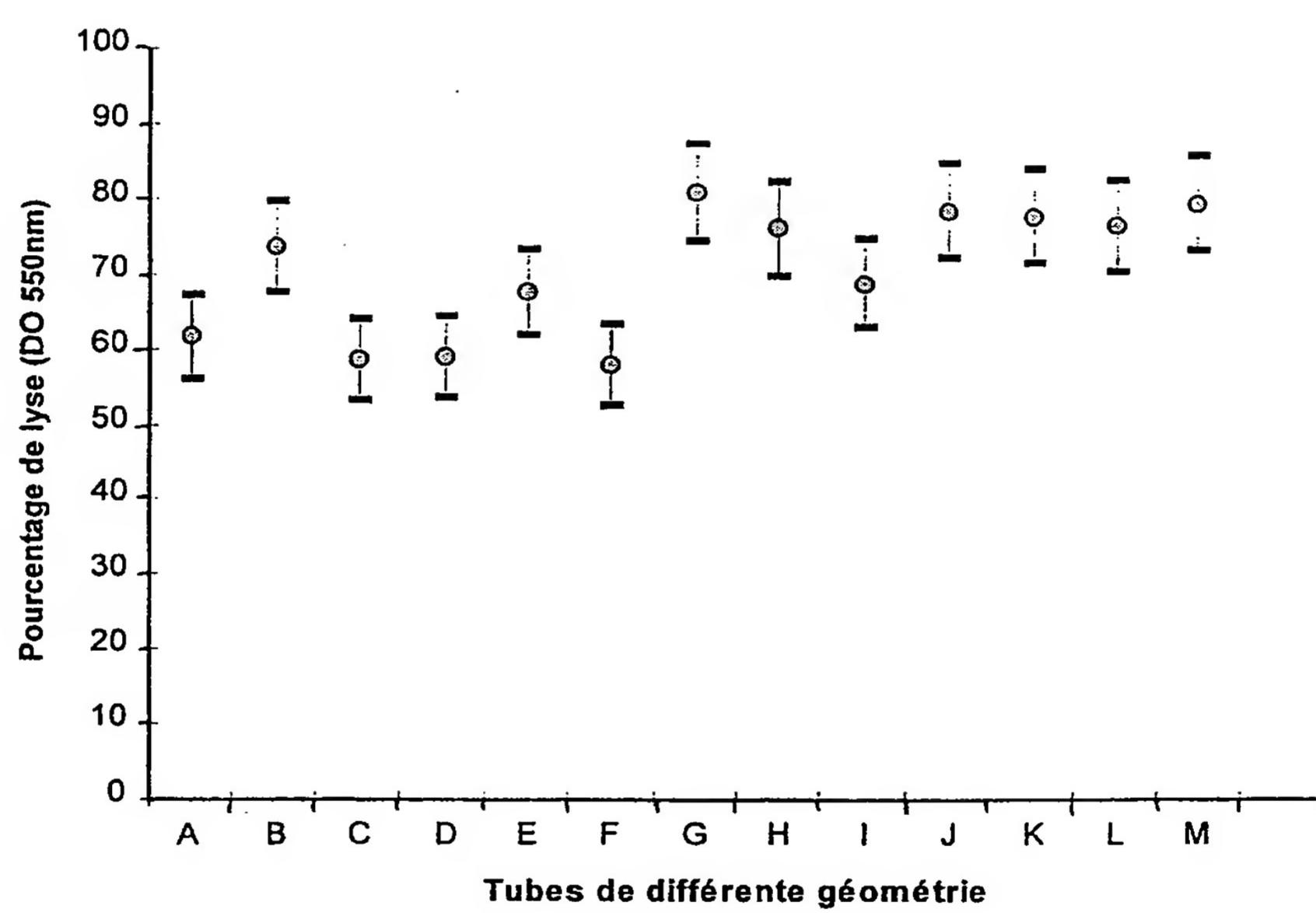


FIGURE 8



**FIGURE 9**

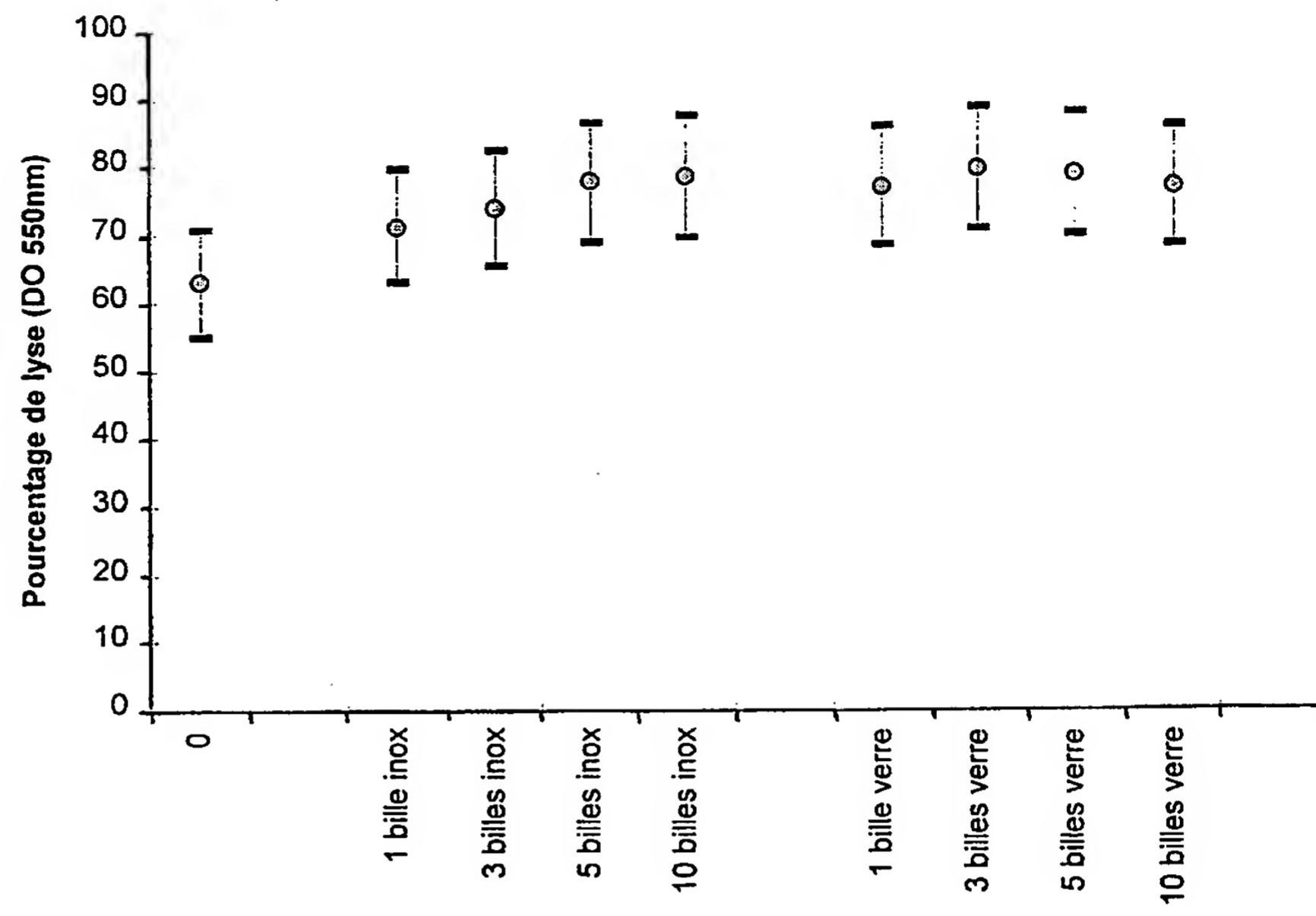
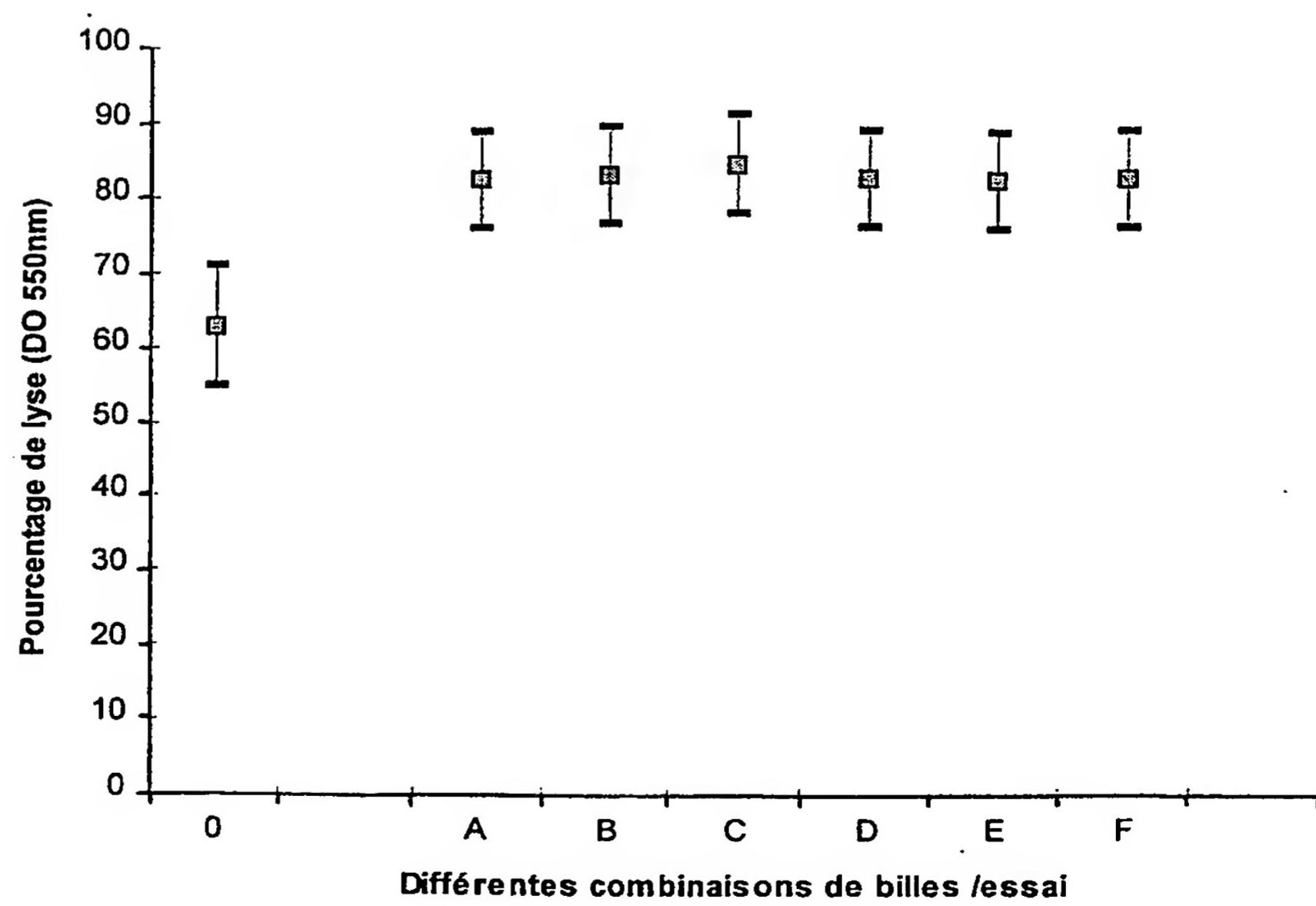
**FIGURE 10****FIGURE 11**

FIGURE 12

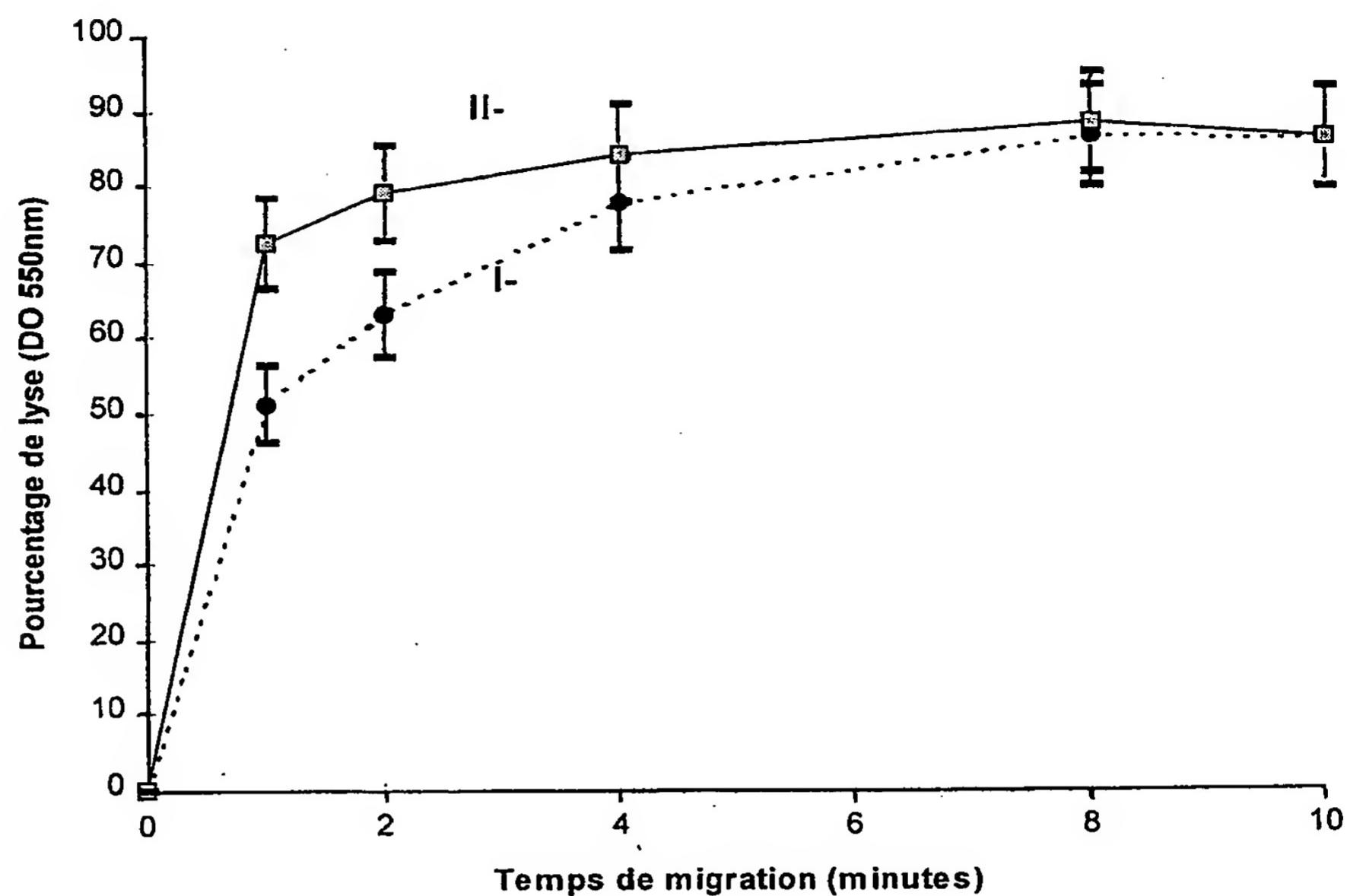
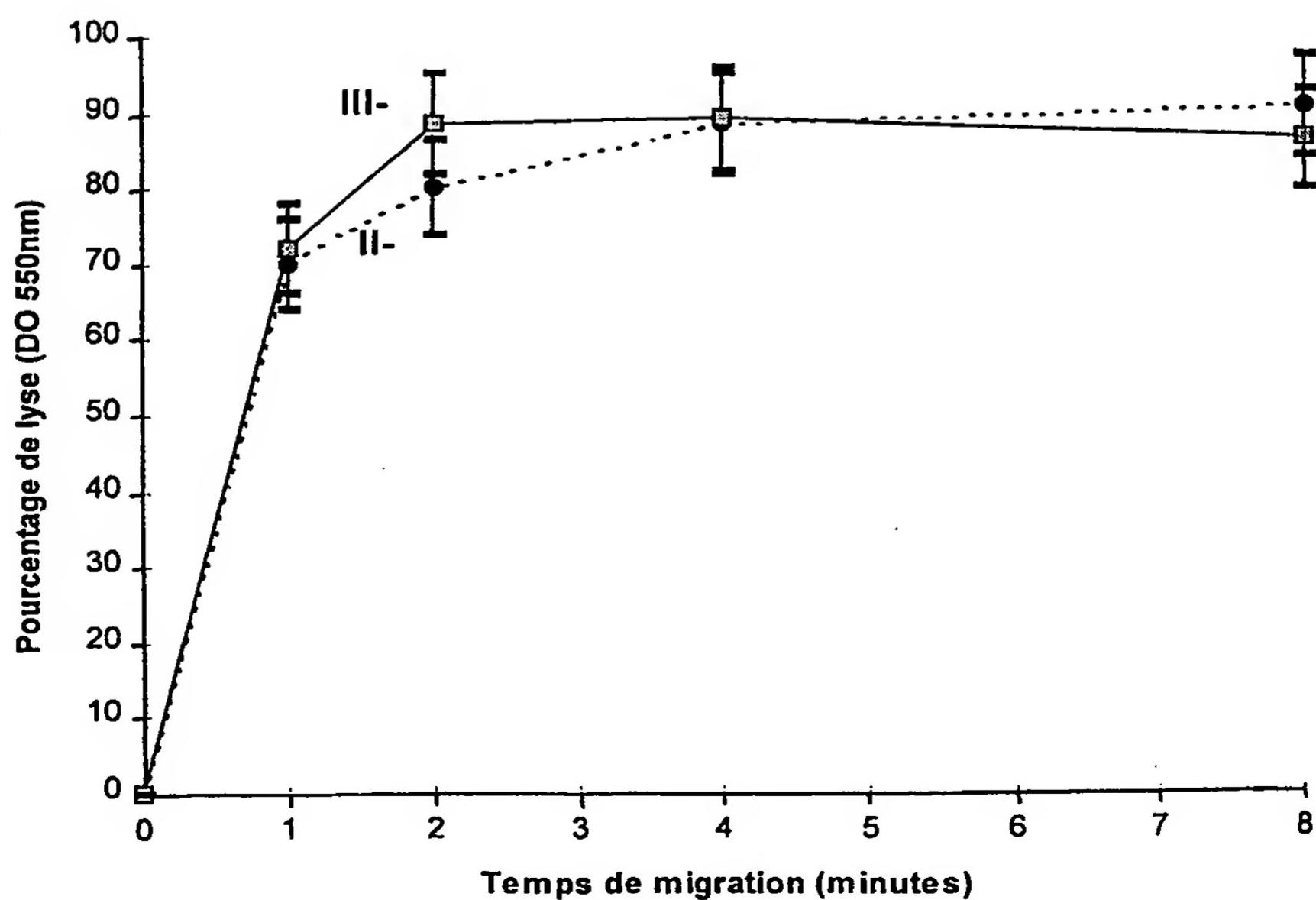


FIGURE 13



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/IB 98/01475

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
 IPC 6 C12M1/33 C12N1/06 C12M3/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12M C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5 643 767 A (FISCHETTI VINCENT A ET AL) 1 July 1997 see column 1, line 1 - line 32; claims 1-3; figures 1-4; examples see column 7, line 53 - line 60 ---	1-18
Y	US 4 295 613 A (MOORE W EDWARD C ET AL) 20 October 1981 cited in the application see claims 1,7 ---	1-18
Y	FR 1 576 299 A (VYZKUMNY USTAV ORGANICKYCH SYNTHEZ PARDUBICE RYBITVI) 25 July 1969 cited in the application see page 4, line 23 - line 27; claims; figure see page 4, column 24 ---	1-3,9,18

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 January 1999

Date of mailing of the International search report

26/01/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Coucke, A

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte...onal Application No

PCT/IB 98/01475

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 317 803 A (ABBOTT LAB) 31 May 1989 see claims ---	1,3
Y	EP 0 288 618 A (GEN PROBE INC) 2 November 1988 see claims ---	1,2, 15-18
Y	US 5 464 773 A (MELENDEZ LUIS A ET AL) 7 November 1995 see column 2, line 14 - line 24; claims ---	1-10
Y	US 4 666 850 A (MEHL JACK J ET AL) 19 May 1987 see claims; figures ---	1-6,8,9, 15
Y	EP 0 341 215 A (CIBA GEIGY AG ;UCP GEN PHARMA AG (CH)) 8 November 1989 see claims ---	4,6,8,9, 15
Y	EP 0 284 044 A (ZYMOGENETICS INC) 28 September 1988 see page 7, paragraph 4; claims ---	4,6,8,9, 15
Y	US 4 775 622 A (HITZEMAN RONALD A ET AL) 4 October 1988 see claims; examples -----	4,6,8,9, 15

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/IB 98/01475

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
US 5643767	A	01-07-1997		EP 0755401 A JP 10501685 T WO 9528409 A		29-01-1997 17-02-1998 26-10-1995
US 4295613	A	20-10-1981		NONE		
FR 1576299	A	25-07-1969		NL 6811627 A		20-02-1969
EP 0317803	A	31-05-1989		US 4873035 A AU 2571588 A CA 1336067 A DE 3881350 A DE 3881350 T ES 2056874 T JP 2139029 A US 5017501 A		10-10-1989 25-05-1989 27-06-1995 01-07-1993 18-11-1993 16-10-1994 29-05-1990 21-05-1991
EP 0288618	A	02-11-1988		AU 604684 B AU 7040487 A CA 1296604 A JP 2026041 C JP 5028599 B JP 62236478 A JP 2097840 C JP 5068553 A JP 8013272 B US 5374522 A		03-01-1991 24-09-1987 03-03-1992 26-02-1996 26-04-1993 16-10-1987 02-10-1996 23-03-1993 14-02-1996 20-12-1994
US 5464773	A	07-11-1995		NONE		
US 4666850	A	19-05-1987		AU 562681 B AU 2906184 A BR 8403243 A DK 512484 A EP 0143329 A JP 1403489 C JP 60102560 A JP 62009316 B MX 172788 B US 4886071 A		18-06-1987 02-05-1985 11-06-1985 29-04-1985 05-06-1985 09-10-1987 06-06-1985 27-02-1987 13-01-1994 12-12-1989
EP 0341215	A	08-11-1989		AT 124086 T AU 614121 B AU 3382889 A DD 283839 A DE 68923123 D DE 68923123 T DK 217589 A ES 2072918 T FI 892114 A IE 66044 B IL 90170 A JP 2104279 A JP 2107291 C JP 8024565 B KR 9705584 B MX 169508 B NO 180593 B		15-07-1995 22-08-1991 09-11-1989 24-10-1990 27-07-1995 30-11-1995 05-11-1989 01-08-1995 05-11-1989 13-12-1995 31-12-1995 17-04-1990 06-11-1996 13-03-1996 18-04-1997 08-07-1993 03-02-1997

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/IB 98/01475

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP 0341215	A	PT	90436 A,B	30-11-1989
EP 0284044	A	28-09-1988	CA 1304020 A DE 3888561 D DE 3888561 T DK 159188 A JP 1016587 A JP 2795850 B	23-06-1992 28-04-1994 01-09-1994 14-12-1988 20-01-1989 10-09-1998
US 4775622	A	04-10-1988	AU 574323 B AU 1215283 A BG 46159 A BR 8301150 A CZ 8301608 A DD 207220 A DE 3308215 A DE 3382694 A DK 111283 A,B, EP 0088632 A FI 830774 A FR 2523152 A GB 2116567 A,B GR 78506 A IE 55743 B JP 8029111 B JP 58174396 A JP 6181779 A OA 7338 A PT 76360 B ZA 8301569 A	07-07-1988 15-09-1983 16-10-1989 22-11-1983 16-07-1997 22-02-1984 17-11-1983 22-07-1993 28-10-1983 14-09-1983 09-09-1983 16-09-1983 28-09-1983 27-09-1984 02-01-1991 27-03-1996 13-10-1983 05-07-1994 31-08-1984 12-02-1986 25-04-1984

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem Internationale No  
PCT/IB 98/01475

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 C12M1/33 C12N1/06 C12M3/08

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 6 C12M C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	US 5 643 767 A (FISCHETTI VINCENT A ET AL) 1 juillet 1997 voir colonne 1, ligne 1 – ligne 32; revendications 1-3; figures 1-4; exemples voir colonne 7, ligne 53 – ligne 60 ---	1-18
Y	US 4 295 613 A (MOORE W EDWARD C ET AL) 20 octobre 1981 cité dans la demande voir revendications 1,7 ---	1-18
Y	FR 1 576 299 A (VYZKUMNY USTAV ORGANICKYCH SYNTHEZ PARDUBICE RYBITVI) 25 juillet 1969 cité dans la demande voir page 4, ligne 23 – ligne 27; revendications; figure voir page 4, colonne 24 ---	1-3,9,18

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

11 janvier 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

26/01/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Coucke, A

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No  
PCT/IB 98/01475

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	EP 0 317 803 A (ABBOTT LAB) 31 mai 1989 voir revendications ---	1,3
Y	EP 0 288 618 A (GEN PROBE INC) 2 novembre 1988 voir revendications ---	1,2, 15-18
Y	US 5 464 773 A (MELENDEZ LUIS A ET AL) 7 novembre 1995 voir colonne 2, ligne 14 - ligne 24; revendications ---	1-10
Y	US 4 666 850 A (MEHL JACK J ET AL) 19 mai 1987 voir revendications; figures ---	1-6,8,9, 15
Y	EP 0 341 215 A (CIBA GEIGY AG ;UCP GEN PHARMA AG (CH)) 8 novembre 1989 voir revendications ---	4,6,8,9, 15
Y	EP 0 284 044 A (ZYMOGENETICS INC) 28 septembre 1988 voir page 7, alinéa 4; revendications ----	4,6,8,9, 15
Y	US 4 775 622 A (HITZEMAN RONALD A ET AL) 4 octobre 1988 voir revendications; exemples -----	4,6,8,9, 15

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem. Internationale No

PCT/IB 98/01475

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5643767 A	01-07-1997	EP 0755401 A JP 10501685 T WO 9528409 A	29-01-1997 17-02-1998 26-10-1995
US 4295613 A	20-10-1981	AUCUN	
FR 1576299 A	25-07-1969	NL 6811627 A	20-02-1969
EP 0317803 A	31-05-1989	US 4873035 A AU 2571588 A CA 1336067 A DE 3881350 A DE 3881350 T ES 2056874 T JP 2139029 A US 5017501 A	10-10-1989 25-05-1989 27-06-1995 01-07-1993 18-11-1993 16-10-1994 29-05-1990 21-05-1991
EP 0288618 A	02-11-1988	AU 604684 B AU 7040487 A CA 1296604 A JP 2026041 C JP 5028599 B JP 62236478 A JP 2097840 C JP 5068553 A JP 8013272 B US 5374522 A	03-01-1991 24-09-1987 03-03-1992 26-02-1996 26-04-1993 16-10-1987 02-10-1996 23-03-1993 14-02-1996 20-12-1994
US 5464773 A	07-11-1995	AUCUN	
US 4666850 A	19-05-1987	AU 562681 B AU 2906184 A BR 8403243 A DK 512484 A EP 0143329 A JP 1403489 C JP 60102560 A JP 62009316 B MX 172788 B US 4886071 A	18-06-1987 02-05-1985 11-06-1985 29-04-1985 05-06-1985 09-10-1987 06-06-1985 27-02-1987 13-01-1994 12-12-1989
EP 0341215 A	08-11-1989	AT 124086 T AU 614121 B AU 3382889 A DD 283839 A DE 68923123 D DE 68923123 T DK 217589 A ES 2072918 T FI 892114 A IE 66044 B IL 90170 A JP 2104279 A JP 2107291 C JP 8024565 B KR 9705584 B MX 169508 B NO 180593 B	15-07-1995 22-08-1991 09-11-1989 24-10-1990 27-07-1995 30-11-1995 05-11-1989 01-08-1995 05-11-1989 13-12-1995 31-12-1995 17-04-1990 06-11-1996 13-03-1996 18-04-1997 08-07-1993 03-02-1997

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem Internationale No

PCT/IB 98/01475

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0341215 A		PT 90436 A, B	30-11-1989
EP 0284044 A	28-09-1988	CA 1304020 A DE 3888561 D DE 3888561 T DK 159188 A JP 1016587 A JP 2795850 B	23-06-1992 28-04-1994 01-09-1994 14-12-1988 20-01-1989 10-09-1998
US 4775622 A	04-10-1988	AU 574323 B AU 1215283 A BG 46159 A BR 8301150 A CZ 8301608 A DD 207220 A DE 3308215 A DE 3382694 A DK 111283 A, B, EP 0088632 A FI 830774 A FR 2523152 A GB 2116567 A, B GR 78506 A IE 55743 B JP 8029111 B JP 58174396 A JP 6181779 A OA 7338 A PT 76360 B ZA 8301569 A	07-07-1988 15-09-1983 16-10-1989 22-11-1983 16-07-1997 22-02-1984 17-11-1983 22-07-1993 28-10-1983 14-09-1983 09-09-1983 16-09-1983 28-09-1983 27-09-1984 02-01-1991 27-03-1996 13-10-1983 05-07-1994 31-08-1984 12-02-1986 25-04-1984

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**